

Erhöhte Immunstimulation durch IRF-1 Expression in Tumorzellen führt zur
Suppression von Tumoren

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Katjana Klages
aus Northeim

1. Referent: Privatdozent Dr. Gerhard Gross
2. Referent: Professor Dr. Jürgen Wehland
eingereicht am: 01.10.2007
mündliche Prüfung (Disputation) am: 06.03.2008

Druckjahr 2008

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Klages, K., Wiese, A., Hauser, H., Kröger, A.: Immunomodulation by Interferon Regulatory Factor-1 in Mouse Tumor Models (Poster), 6th International Cytokine Conference, Wien. Sonderheft: Eur Cytokine Netw 17, 94 (2006).

Klages, K., Wiese, A., Hauser, H., Kröger, A.: Interferon Regulatory Factor-1 mediates Tumor-suppressive Effects in Mouse Tumor Models (Poster), Summer School HZI Braunschweig, Molecular Interactions during Infection, Quedlinburg (2006).

Klages, K., Stirnweiss, A., Hauser, H., Kröger, A.: Tumorsuppressive Effects of Interferon Regulatory Factor-1 (Poster), Summer School MDC Berlin/DKFZ Heidelberg, Signal Transduction and Transcriptional Regulation in Cancer, Groß Dölln (2007)

Klages K., Stirnweiss A., Reimann J., Hauser H. and Kröger A.: Expression of Interferon Regulatory Factor-1 in CT26 Colon Carcinoma Cells induces Antitumor Activity (Poster), 37th Annual Meeting of the German Society for Immunology, Heidelberg (2007)

Klages K., Stirnweiss A., Hauser H., Kröger A.: Induction of Antitumor Activity in a Mouse Colon Carcinoma Model by Interferon Regulatory Factor-1 (Poster), 9th DGZ Young scientists Meeting, Signaling Cascades in Development and Disease, Münster (2007)

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG **VII**

1 EINLEITUNG **1**

1.1 KREBS	1
1.1.1 TUMORENTSTEHUNG UND -ENTWICKLUNG	1
1.1.2 DAS PRINZIP DER IMMUNÜBERWACHUNG	4
1.1.3 IMMUNTHERAPIE ZUR BEHANDLUNG VON TUMOREN	9
1.2 INTERFERONE UND DEREN ROLLE BEI DER IMMUNÜBERWACHUNG	10
1.2.1 DIE INTERFERON REGULATORY FACTOR (IRF) FAMILIE	12
1.2.2 INTERFERON REGULATORY FACTOR-1 (IRF-1)	13
1.2.3 TUMORSUPPRESSIVE UND ANTIPROLIFERATIVE EIGENSCHAFTEN VON IRF-1	15
1.2.4 EINFLUß VON IRF-1 AUF DAS IMMUNSYSTEM	16
1.3 AUFGABENSTELLUNG	18

2 ERGEBNISSE **19**

2.1 MAUSTUMORMODELLE	20
2.1.1 REGULATION DER IRF-1 AKTIVITÄT IM IRF-1HER FUSIONSPROTEIN	21
2.1.2 TETRAZYKLIN-ABHÄNGIGE REGULATION DER IRF-1 EXPRESSION	22
2.2 VERÄNDERUNG DES PHÄNOTYPS DURCH EXPRESSION VON IRF-1 IN TUMORZELLEN	25
2.2.1 PROLIFERATION UND DIE KOLONIEBILDUNG	25
2.2.2 REVERSION DES ONKOGENEN PHÄNOTYPS DURCH IRF-1	28
2.2.3 IRF-1 VERMITTELTE INDUKTION DER IFN- β -EXPRESSION	29
2.2.4 ERHÖHUNG DER MHC KLASSE I EXPRESSION	30
2.2.5 VERBESSERTE ELIMINIERUNG VON TUMORZELLEN DURCH ZYTOTOXISCHE T-ZELLEN	31
2.2.6 INDUKTION VON CHEMOKINEN	33
2.2.7 VERBESSERTE ANLOCKUNG VON LYMPHOZYTEN	35
2.3 EINFLUß VON IRF-1 AUF DAS WACHSTUM VON TUMOREN IN VIVO	36
2.3.1 TUMORWACHSTUM IN NACKTMÄUSEN	36
2.3.2 REDUKTION VON TUMOREN IN SYNGENEN MÄUSEN	38
2.4 CHARAKTERISIERUNG EINER TUMORSPEZIFISCHEN T-ZELL-VERMITTELTEN IMMUNANTWORT	39
2.4.1 ERSTELLUNG DES LYMPHOZYTENPROFILS IN MILZ UND DRAINIERENDEN LYMPH-KNOTEN	39
2.4.2 INDUKTION DER IFN γ -SYNTHESE IN AKTIVIERTEN ZYTOTOXISCHEN T-ZELLEN	44
2.4.3 LYSE VON TUMORZELLEN DURCH SPEZIFISCHE ZYTOTOXISCHE T-ZELLEN	46
2.5 CHARAKTERISIERUNG DER TUMORSPEZIFISCHEN IMMUNANTWORT IN VIVO	48
2.5.1 INDUKTION EINER TUMORSPEZIFISCHEN IMMUNANTWORT <i>IN VIVO</i>	48
2.5.2 ABSTOßUNG VON ETABLIERTEN TUMOREN NACH IRF-1 EXPRESSION	49
2.5.3 ABSTOßUNG VON PARTIELL IRF-1 EXPRIERENDEN TUMOREN	50

3	DISKUSSION	53
3.1	VERGLEICH ZWEIER SYSTEME ZUR KONDITIONELLEN EXPRESSION VON IRF-1	53
3.2	ANTIPROLIFERATIVE WIRKUNG DURCH DIE EXPRESSION VON IRF-1	57
3.3	WIRKUNG VON IRF-1 AUF DIE TRANSFORMATION UND DAS TUMORWACHSTUM IN IMMUNDEFIZIENTEN MÄUSEN	59
3.4	TUMORSUPPRESSIVE UND IMMUNMODULATORISCHE WIRKUNG VON IRF-1 IN SYNGENEN MÄUSEN	60
3.5	IRF-1 IN DER IMMUNTHERAPIE ZUR BEHANDLUNG VON TUMOREN	64
4	MATERIAL UND METHODEN	67
4.1	GERÄTE UND CHEMIKALIEN	67
4.1.1	GERÄTE	67
4.1.2	CHEMIKALIEN	68
4.1.3	ZELLKULTURMATERIAL	69
4.2	COMPUTERPROGRAMME	69
4.3	STERILISATION	69
4.3.1	STERILISATION DURCH HITZE	69
4.3.2	STERILISATION DURCH FILTRATION	69
4.4	ARBEITEN MIT E.COLI	69
4.4.1	VERWENDETE STÄMME	69
4.4.2	KULTURMEDIENTEN FÜR BAKTERIEN	70
4.4.3	HERSTELLUNG VON AGARPLATTEN	70
4.4.4	HERSTELLUNG ELEKTROKOMPETENTER BAKTERIEN	70
4.4.5	ELEKTROTRANSFORMATION KOMPETENTER BAKTERIEN	70
4.4.6	KONSERVIERUNG VON BAKTERIEN	71
4.5	ARBEITEN MIT EUKARYONTISCHEN ZELLINIEN	71
4.5.1	VERWENDETE ZELLINIEN UND VIREN	71
4.5.2	GRUNDMEDIENTEN UND LÖSUNGEN	71
4.5.3	KULTURMEDIENTEN	72
4.5.4	KULTIVIERUNG VON SÄUGERZELLEN	73
4.5.5	ZELLZAHLBESTIMMUNG	73
4.5.6	LANGZEITLAGERUNG VON SÄUGERZELLEN	73
4.5.7	BESTIMMUNG DER PROLIFERATION	73
4.5.8	FORMATION VON WEICHAGAR-KOLONIEN	74
4.6	ARBEITEN MIT LENTIVIREN	74
4.6.1	HERSTELLUNG VON LENTIVIREN	74
4.6.2	INFEKTION MIT LENTIVIREN	75
4.7	ARBEITEN MIT FRISCH ISOLIERTEN MURINEN LYMPHOZYTEN	75
4.7.1	ISOLIERUNG VON MURINEN LYMPHOZYTEN AUS DER MILZ	75
4.7.2	ISOLIERUNG VON MURINEN LYMPHOZYTEN AUS LYMPHKNOTEN	75
4.7.3	STIMULATION MURINER LYMPHOZYTEN IN VITRO	76
4.7.4	LAGERUNG VON LYMPHOZYTEN	76
4.8	ISOLIERUNG UND AUFREINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN	76
4.8.1	ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS BAKTERIEN IM ANALYTISCHEN MAßSTAB	76
4.8.2	ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA IM PRÄPARATIVEN MAßSTAB (QUIAGEN)	77
4.8.3	ISOLIERUNG VON DNA AUS AGAROSEGELEN (QIAQUICK-KIT, QUIAGEN)	78
4.8.4	ISOLIERUNG VON GESAMT-RNA	78
4.8.5	PHENOLISIEREN VON DNA	78

4.8.6	FÄLLUNG VON DNA	79
4.9	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN	79
4.9.1	PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG	79
4.10	MODIFIZIERUNG VON DNA	80
4.10.1	SPALTUNG VON DNA MIT RESTRIKTIONSENZYMEN	80
4.10.2	AUFFÜLLEN VON 5'-ÜBERSTEHENDEN ENDEN	80
4.10.3	DEPHOSPHORYLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN	80
4.10.4	LIGATION VON DNA-FRAGMENTEN	81
4.10.5	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	81
4.11	CHARAKTERISIERUNG VON NUKLEINSÄUREN	82
4.11.1	POLYMERASE KETTENREAKTION (PCR)	82
4.11.2	RT-PCR	83
4.11.3	QUANTITATIVE REAL TIME PCR	83
4.11.4	SEQUENZIERUNG VON DNA	83
4.12	GENTRANSFERMETHODEN	84
4.12.1	TRANSFEKTION MITTELS CALCIUMPHOSPHAT/DNA PRÄZIPITATION	84
4.12.2	TRANSFEKTION MITTELS METAFFECTENE	84
4.12.3	DURCHFÜHRUNG EINER SELEKTION	84
4.13	PROTEINANALYTIK	85
4.13.1	ZELLAUFSCHLUSS	85
4.13.2	PROTEINBESTIMMUNG (BCA-ASSAY)	85
4.13.3	POLYACRYLAMID GELELEKTROPHORESE	86
4.13.4	WESTERN BLOT	86
4.13.5	BESTIMMUNG DER LUCIFERASE-AKTIVITÄT	87
4.13.6	BESTIMMUNG VON INTERFERON	87
4.13.7	DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS) ZUR ANALYSE UND ZELLSORTIERUNG	88
4.14	T-ZELL ASSAYS	89
4.14.1	NACHWEIS VON INTRAZELLULÄREM IFN γ	89
4.14.2	CR-RELEASE ASSAY	89
4.15	TUMORSTUDIEN IN MÄUSEN	91
4.15.1	VERWENDETE MAUSLINIEN	91
4.15.2	TUMORWACHSTUM <i>IN VIVO</i>	91
4.16	ANTIKÖRPER	92
4.16.1	ANTIKÖRPER FÜR FACS-ANALYSEN	92
4.16.2	ANTIKÖRPER FÜR WESTERN BLOTS	92
4.17	VEKTOREN	93
4.17.1	VERWENDETE VEKTOREN	93
4.17.2	HERGESTELLTE VEKTOREN	93
5	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	94
6	LITERATURVERZEICHNIS	96

Zusammenfassung

Der Transkriptionsfaktor IRF-1 steuert Gene der Pathogenabwehr, Proliferation, Immunaktivierung und Entzündung. IRF-1 wirkt als Tumorsuppressor und vermittelt seine Wirkung sowohl über einen intrinsischen, wachstumsinhibierenden Effekt, als auch über einen systemischen, das Immunsystem aktivierenden Effekt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung der IRF-1 Effekte auf die Proliferation und Transformation *in vitro* und *in vivo* sowie der Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort im murinen CT26 Darmkarzinom-Modell. Dazu wurde die IRF-1 Expression konditional in diesen Tumorzellen etabliert.

Die konditionale Expression von IRF-1 führt zur Inhibition der Proliferation und zur Reversion des onkogenen Phänotyps. Diese Effekte vermitteln jedoch keine ausreichende Protektion vor Tumoren, da IRF-1 in immundefizienten Nacktmäusen zwar eine Reduktion der Wachstumsrate subkutaner Tumore aber keine vollständige Abstoßung bewirkt.

Die Induktion von IRF-1 in Tumorzellen erhöht die MHC Klasse I Expression auf der Zelloberfläche und führt zu einer verbesserten Eliminierung von Tumorzellen durch spezifische CTLs *in vitro*. IRF-1 induziert außerdem die Expression von Chemokinen sowie IFN- β und vermittelt eine erhöhte Attraktion von Lymphozyten *in vitro*.

Im Gegensatz zu Tumoren in immundefizienten Mäusen werden Tumore in immunkompetenten Mäusen durch IRF-1 Expression in Tumorzellen abgestoßen. Die Analyse der Milzzellen zeigte die Anwesenheit von tumorspezifischen CTLs, die IFN- γ produzieren und Tumorzellen *in vitro* eliminieren können. Ein immunologischer Schutz vor Sekundärtumoren konnte in „Challenge“ Experimenten nachgewiesen werden. Es wurde also gezeigt, dass IRF-1 eine tumorprotektive Immunantwort in syngen Mäusen induzieren kann.

In weiteren Experimenten wurde evaluiert, inwieweit IRF-1 zur Therapie eingesetzt werden kann. Voraussetzung dafür ist die Fähigkeit, das Wachstum bereits vorhandener Tumore zu verlangsamen oder zu stoppen. Die Expression von IRF-1 in etablierten Tumoren führt in der Mehrzahl der Mäuse zur Reduktion der Tumormasse oder zur Abstoßung des Tumors. Die *in vivo* Einbringung von IRF-1 in einen Tumor mittels Gentransfer würde nicht zur Expression in allen Tumorzellen führen, da die Transfermethoden nicht effizient genug sind. Die Expression von IRF-1 in einem Viertel der Tumorzellen erwies sich als ausreichend, um das Tumorwachstum zu verlangsamen oder die Tumorabstoßung zu bewirken. Die Entwicklung einer Tumorthherapie unter Mitwirkung von IRF-1 scheint daher möglich.

1 Einleitung

1.1 Krebs

Nach Herz-Kreislauf-erkrankungen ist Krebs in der westlichen Welt die zweithäufigste Todesursache beim Menschen. Jedes Jahr erkranken 425.000 Menschen allein in Deutschland an Krebs (Brenner et al. 2005). Krebs ist eine durch unkontrollierte Proliferation körpereigener Zellen entstandene abnormale Vergrößerung eines Gewebes.

Praktisch alle Säugetierzellen haben die gleiche molekulare Maschinerie, die zelluläre Prozesse wie die Proliferation, die Differenzierung und den Zelltod reguliert. Durch genetische Veränderungen angefangen von Punktmutationen bis hin zum Austausch von ganzen Chromosomenabschnitten in Genen, die diese Prozesse regulieren, erhalten einzelne Zellen einen Wachstumsvorteil. Durch weitere Mutationen kommt es zur ungethemmten Proliferation und zur Bildung von Tumoren.

Entsteht durch Mutation der den Zellzyklus beeinflussenden Gene eine erhöhte Expression und somit eine verstärkte Stimulation des Zellwachstums, so spricht man von zellulären Onkogenen. Im Gegensatz zu den proliferationsaktivierenden Onkogenen stehen Tumorsuppressorgene, die an der Übermittlung von wachstumshinibierenden Signalen beteiligt sind. Mutationen in Tumorsuppressorgenen führen durch einen Verlust der Funktion zu unkontrollierter Proliferation. Eine ganze Reihe von Veränderungen in diesen Genen sind mit humanen Tumoren assoziiert, wie Mutationen in ras-, myc-, erbB- oder her-Onkogenen sowie Funktionsverlustmutationen in den Tumorsuppressoren Rb, p53, APC, BRCA-1/-2.

Murine Zellen benötigen mindestens zwei genetische Veränderungen, bevor sie einen tumorigenen Phänotyp zeigen. In humanen Zellen müssen mehrere Mutationen auftreten, bevor die Zellen onkogen transformiert sind (Hahn et al. 1999). Ionisierende Strahlung, chemische Karzinogene, Viren sowie statistisch auftretende Spontanmutationen, gegebenenfalls auch im Zusammenhang mit familiären Dispositionen, können Ursachen für genetische Veränderungen sein.

1.1.1 Tumorentstehung und -entwicklung

Die Karzinogenese im Menschen ist ein in mehreren Schritten ablaufender Prozess, bei dem durch eine sukzessive Ansammlung von Mutationen aus normalen Zellen hochmaligne Tumorzellen entstehen. Tumorzellen zeigen Defekte in den regulatorischen Netz-

werken, die die normale Zellproliferation und Homeostase regeln. Hierbei gibt es sechs essentielle Veränderungen auf dem Weg zur Tumorzelle: die Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, die Insensitivität gegenüber wachstumshemmenden Signalen, die Umgehung des programmierten Zelltods, die unlimitierte Replikation, eine verstärkte Angiogenese und die Fähigkeit zur Invasion und Metastasenbildung (Abb. 1.1).

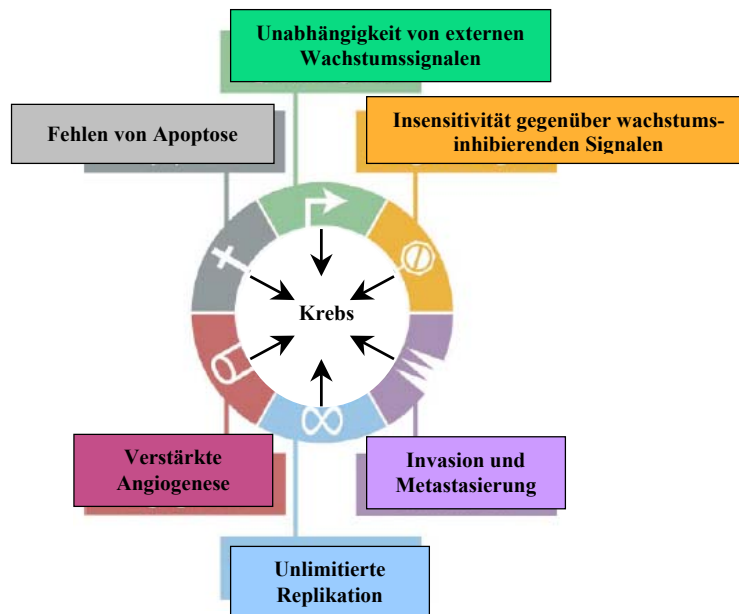


Abb. 1.1 Erworbene Merkmale von Tumorzellen

Tumore erwerben während ihrer Entstehung verschiedene funktionelle Eigenschaften, die ein malignes Wachstum ermöglichen: 1. Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, 2. Insensitivität gegenüber wachstumshemmenden Signalen, 3. Umgehung des programmierten Zelltods, 4. unlimitierte Replikation, 5. verstärkte Angiogenese, 6. Invasion und Metastasenbildung. Verändert nach (Hanahan and Weinberg 2000).

Normale Zellen brauchen aus der Umgebung mitogene Wachstumssignale, um die Zellproliferation zu aktivieren. Diese Signale werden in die Zelle durch Transmembran-Rezeptoren übermittelt, an die lösliche Wachstumsfaktoren, extrazelluläre Matrixkomponenten oder Zell-Zell-Interaktionsmoleküle binden. Viele Tumorzellen erwerben die Fähigkeit, autokrin wirkende Wachstumsfaktoren zu synthetisieren und somit unabhängig vom umgebenden Gewebe zu sein, wie z.B. die Produktion von Platelet-derived Growth Factor (PDGF) oder Tumor Growth Factor- α (TGF- α) durch Glioblastome und Sarkome. Durch Überexpression der Wachstumsfaktor-Rezeptoren kann die Sensitivität stark erhöht werden, so dass schon die basale Konzentration an Wachstumsfaktoren zu einer Stimulation führt. So sind der Her2/neu-Rezeptor in vielen Mammakarzinomen und der

epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R) in vielen Magen-, Brust- und Gehirntumoren überexprimiert (Slamon et al. 1987).

Im Gegensatz zu den Wachstumssignalen stehen wachstumsinhibierende Signale, die über lösliche Faktoren oder inhibitorische Moleküle auf Nachbarzellen die Zelle veranlassen, die Proliferation zu blockieren und in der G₀-Phase des Zellzyklus zu verbleiben. Die wichtigste antiproliferative Signalkette ist der pRb-Weg. Der pRb-Weg ist in vielen humanen Tumoren blockiert, wie z.B. durch den Verlust der TGF- β Rezeptorfunktion (Markowitz et al. 1995). Eine andere Blockade des Tumorsuppressor-Proteins pRb wird durch das virale Onkoprotein E7 des humanen Papilloma Virus verursacht, welches Gebärmutterhalskrebs verursachen kann (Dyson et al. 1989). Das Retinoblastoma Protein (pRb) blockiert im hypophosphorylierten Zustand durch Bindung von E2F Transkriptionsfaktoren die Proliferation, da die Transkription von Genen für die Progression von der G₁- in die S-Phase behindert wird (Weinberg 1995).

Der programmierte Zelltod, die Apoptose, ist ein wichtiges Kontrollsystem, um der Entstehung von malignen Zellen entgegen zu wirken. Intrazelluläre Sensoren registrieren DNA-Schäden und können das Apoptose-Programm und somit die Aktivierung von Caspasen auslösen, die zelluläre Strukturen und das Genom zerstören (Evan and Littlewood 1998). Extrazelluläre Sensoren erkennen Todes- und Überlebenssignale aus dem umliegenden Gewebe, die ebenfalls die Zelle beeinflussen und Apoptose auslösen können. Mutationen im Tumorsuppressor Gen p53, der daraus resultierende Verlust der Sensorfunktion von p53 DNA-Schäden zu erkennen und über die Induktion proapoptischer Faktoren die Apoptose auszulösen, sind in mehr als 50% humaner Tumore zu finden (Harris 1996).

Das replikative Potential von Zellen ist durch die Länge der Telomere, das sind 6-Basenpaar-Sequenzwiederholungen an den Enden der Chromosomen, festgelegt. Da die DNA Polymerase die 3'-Enden der chromosomalen DNA nicht komplett replizieren kann, geht bei jeder Zellteilung ein Stück verloren, bis die Telomere aufgebraucht sind und die Zelle stirbt (Counter et al. 1992). In fast allen malignen Zellen ist die Expression des Enzyms Telomerase hochreguliert, das Hexanukleotide an die Enden telomerer DNA addiert und somit unlimitierte Replikation ermöglicht.

Normalerweise liegen alle Zellen in einem Gewebe mindestens 100 μ m vom nächsten Blutgefäß entfernt, um ausreichend mit Nährstoffen versorgt zu werden. Ein wachsender Tumor muß daher ab einer bestimmten Größe die Angiogenese fördern, um neue Blut-

gefäße anzulegen (Bouck et al. 1996). Viele Tumore zeigen eine veränderte Genexpression, die das Gleichgewicht von Angiogenese-inhibierenden Faktoren wie dem „Fibroblast Growth Faktor“ (FGF) zu Angiogenese-stimulierenden Faktoren wie dem „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) verschieben, um so die Angiogenese zu induzieren (Hanahan and Folkman 1996).

Die Bildung von Metastasen ist bei über 90% aller humanen Tumore die Todesursache. Die Fähigkeit zur Invasion ermöglicht den Tumorzellen entfernt vom primären Tumorherd in anderen Geweben des Körpers zu wachsen. Hierzu ist eine Veränderung der Expression von Zelladhäsionsmolekülen der Cadherin Familie, der Integrine, sowie von extrazellulären Proteasen nötig. Die Mehrheit der Epithelialkarzinome zeigt z.B. einen Verlust der E-Cadherin Funktion durch Mutation im E-Cadherin Gen oder β -Catenin Gen (Christofori and Semb 1999).

Die Ansammlung dieser verschiedenen Mutationen auf dem Weg zur Tumorentstehung kann grob in drei Stadien eingeteilt werden: Die Initiation, die Promotion und die Progression. Bei der Initiation kommt es zu einer der oben beschriebenen Mutationen, die Zelle unterscheidet sich jedoch phänotypisch noch nicht vom umliegenden Gewebe. In der Promotion wird durch weitere Mutationen ein die Proliferation begünstigender Phänotyp sichtbar, die Zellen verbreiten sich. Ereignen sich in einer dieser Zellen weitere Mutationen entsteht ein maligner Phänotyp, es kommt zur unkontrollierten Proliferation und Metastasenbildung (Progression).

Um ungehindert wachsen zu können, müssen die Tumorzellen eine weitere Eigenschaft haben, sie müssen in der Lage sein, der Erkennung und Eliminierung durch das Immunsystem zu entgehen. Das Prinzip der Immunüberwachung und das Entkommen eines Tumors wird im nächsten Kapitel beschrieben.

1.1.2 Das Prinzip der Immunüberwachung

Die Theorie, dass das Immunsystem permanent durch Mutationen entstehende Tumore überwacht und bekämpft, wurde von Thomas und Burnet unter der „Cancer Immunsurveillance“ Hypothese, dem Prinzip der Immunüberwachung, zusammengefaßt (Burnet 1970). Zur Erkennung und Inaktivierung von mutierten Zellen und somit zur Aufrechterhaltung der Homeostase wurde ein immunologischer Mechanismus postuliert (Burnet 1957).

Frühe Experimente mit athymischen Nacktmäusen (CBA/H Stamm), die keine sich im Thymus entwickelnden T-Zellen haben, zeigten jedoch, dass die Entwicklung chemisch induzierter Tumore in diesen Mäusen nicht höher lag als in Wildtyp (wt) Mäusen (Stutman 1974). Die Entstehungsrate spontaner Tumore zeigte ebenfalls keine Unterschiede (Rygaard and Povlsen 1974). Das Prinzip der Immunüberwachung wurde daraufhin angezweifelt. Im nachhinein erwies sich der CBA/H Mausstamm jedoch als hoch sensitiv gegenüber dem tumorinduzierenden Karzinogen Methylcholanthren (MCA). Die MCA-induzierte Transformationsrate in diesen Mäusen war daher wahrscheinlich so hoch, dass die immunologischen Abwehrmechanismen überwältigt wurden und somit keine Unterschiede festzustellen waren. Die Dauer der Studien zur spontanen Tumorentstehung war mit 3-7 Monaten nicht lang genug. Außerdem wurden diese Experimente vor der Entdeckung von Lymphozytenpopulationen wie „Natural Killer“ (NK) Zellen oder $\gamma\delta$ T-Zellen durchgeführt. Wiederholungen der Experimente mit MCA-induzierten Tumoren zeigten, dass in Nacktmäusen mit Balb/c Hintergrund oder in SCID-Mäusen (Severe combined Immunodeficiency) mehr Tumore auftraten als in Balb/c Kontrollmäusen (Engel et al. 1996; Engel et al. 1997). Durch diese Studien wurde ein Hinweis auf die Beteiligung des Immunsystems an der Erkennung und Abwehr von Tumoren erbracht.

Durch die Etablierung von Knockout (KO) Mauslinien konnten Tumorstudien in Mäusen mit definierten immunologischen Defekten durchgeführt werden. RAG defizienten Mäusen fehlt das Recombination Activating Gene-1 (RAG-1) oder RAG-2, dessen Genprodukt ein Enzym zur Reparatur von Doppelstrang-DNA Brüchen ist. RAG Enzyme werden ausschließlich im lymphoiden Kompartiment exprimiert, daher ist die DNA-Reparatur in nicht-lymphoiden Körperzellen nicht beeinträchtigt. Da die Rekombination der T- und B-Zellrezeptoren nicht möglich ist, haben diese Mäuse weder NKT-Zellen noch T-Zellen oder B-Zellen. RAG-2 KO-Mäuse entwickelten nach MCA Injektion eine höhere Anzahl an Sarkomen in kürzerer Zeit als wt Kontrollmäuse. Außerdem entwickelten sich mehr spontane Epithelialtumore sowie spontane Neoplasien und Adenokarzinome im Intestinaltrakt (Shankaran et al. 2001).

Desweiteren wurde gezeigt, dass Perforin-defiziente Mäuse anfälliger gegenüber MCA-induzierten Tumoren waren als wt Mäuse (van den Broek et al. 1996; Street et al. 2002). Perforin ist eine Komponente der zytolytischen Granula von zytotoxischen T-Zellen (CTLs) und NK-Zellen und vermittelt die Eliminierung deren Zielzellen wie z.B. Tumor-

zellen. Perforin KO-Mäuse zeigten außerdem ein erhöhtes Vorkommen an Lymphomen, welches bei einem $p53^{+/-}$ Hintergrund noch höher war (Smyth et al. 2000).

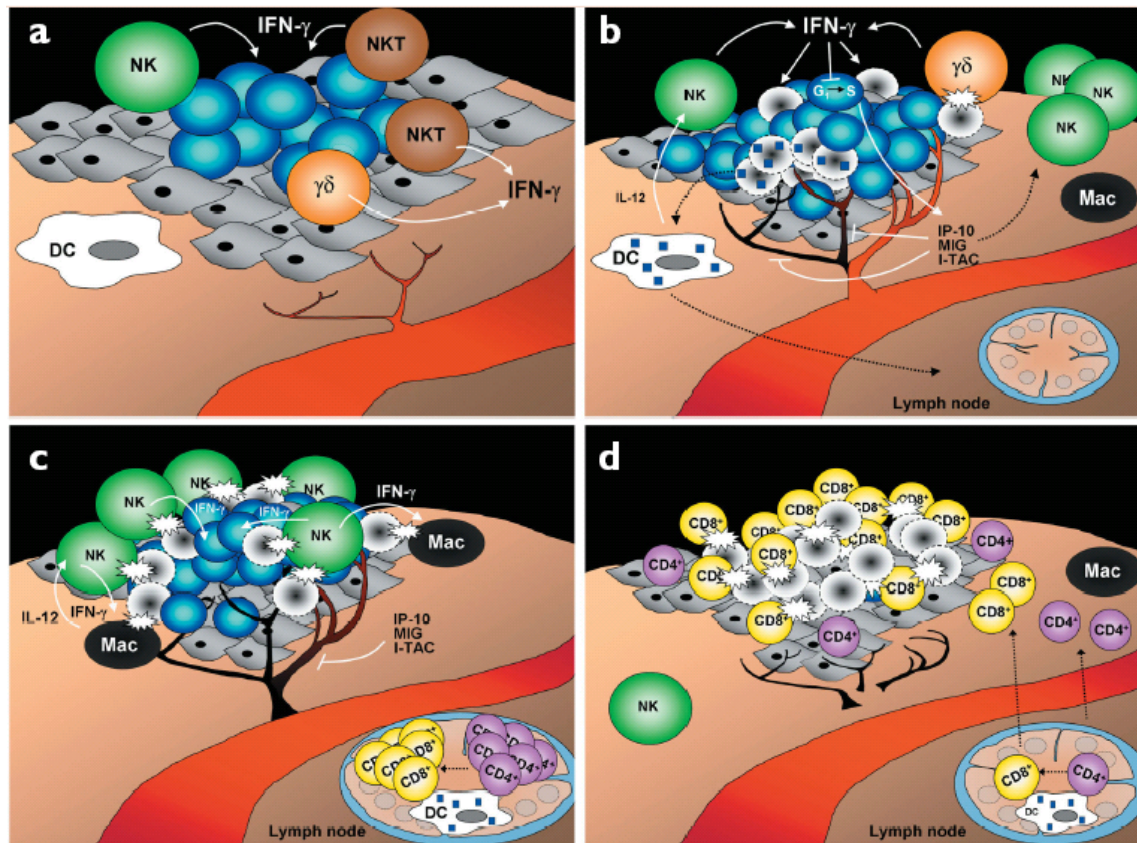


Abb. 1.2: Eliminierung von Tumoren durch das Immunsystem

A: Zellen des angeborenen Immunsystems (NKT, NK, $\gamma\delta$ T-Zellen) erkennen transformierte Zellen und produzieren IFN- γ . B: IFN- γ startet eine Reihe von Immunreaktionen: I. Chemokine werden induziert, die die Neovaskularisation inhibieren und weitere Immunzellen wie NK-Zellen, DCs und Makrophagen (Mac) rekrutieren. II. IFN- γ wirkt antiproliferativ auf die Tumorzellen. III. Durch die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen und Makrophagen werden Tumorzellen eliminiert. Dendritische Zellen nehmen Tumorantigene auf und wandern zu den drainierenden Lymphknoten. C: Tumorspezifische CD4 $^{+}$ und CD8 $^{+}$ T-Zellen proliferieren im Lymphknoten. D: CD4 $^{+}$ und CD8 $^{+}$ T-Zellen wandern zum Tumorherd und eliminieren Tumorzellen, die ein spezifisches Tumorantigen exprimieren. Tumorzellen (blau), nicht transformierte Zellen (grau), tote Tumorzellen (weiß/grau), Tumorantigene (blaue Quadrate). Nach (Dunn et al. 2002).

Weitere Tumorstudien haben gezeigt, dass Defekte in NKT-, $\gamma\delta$ T-, $\alpha\beta$ T-, NK-Zellen und andere Immundefekte zu einer erhöhten Suszeptibilität des Wirts gegenüber Tumoren führen (Smyth et al. 2000; Girardi et al. 2001). Diese Daten untermauern das Prinzip der Immunüberwachung von Burnet und Thomas, wonach ein funktionelles Immunsystem in der Lage ist, primäre Tumore zu erkennen und zu eliminieren und dass Lymphozyten sowie deren produzierte Zytokine eine wichtige Rolle dabei spielen.

Erreicht ein solider Tumor eine bestimmte Größe, benötigt er eine erhöhte Blutzufuhr, die durch Stimulation der Angiogenese erreicht wird. Durch invasives Wachstum entstehende kleine Disruptionen im Nachbargewebe induzieren inflammatorische Signale, die Zellen des angeborenen Immunsystems, wie NKT-, NK-, $\gamma\delta$ T-Zellen, Makrophagen und Dendritische Zellen anlocken (Abb. 1.2A). Werden die transformierten Zellen durch Strukturen, wie z.B. die niedrige MHC-Expression auf ihrer Oberfläche von NKT-, NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen erkannt, produzieren diese Zellen IFN- γ . Das IFN- γ übt zum einen antiproliferative und apoptotische Einflüsse auf die Tumorzellen aus, zum anderen induziert es die Expression von Chemokinen wie CXCL10, CXCL9 oder CXCL11. Die Chemokine hemmen die Angiogenese und rekrutieren mehr Lymphozyten zum Ort des Tumors (Abb. 1.2B). Tumorinfiltrierende NK-Zellen und Makrophagen produzieren IFN- γ und IL-12, transaktivieren sich gegenseitig und eliminieren einen Teil der Tumorzellen.

Dendritische Zellen nehmen Tumorantigene auf, wandern zum drainierenden Lymphknoten und präsentieren naiven CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen die antigenspezifischen Tumorpeptide (Abb. 1.2C). Tumorspezifische T-Zellen werden zur Proliferation im drainierenden Lymphknoten angeregt und wandern entlang eines Chemokingradienten zum Ort des Tumors. Zytotoxische T-Zellen erkennen und eliminieren die Tumorantigen-exprimierenden malignen Zellen (Abb. 1.2D).

Die „Cancer Immunosurveillance“ Hypothese von Burnet und Thomas wurde erweitert und unter dem Begriff „Cancer Immunoediting“ zusammengefaßt. Das Immunsystem übt während der Entstehung von Tumoren eine duale Rolle aus: Neben der vollständigen Eliminierung von Tumoren durch Lymphozyten können neue Tumorzellvarianten durch den immunologischen Druck selektiert werden und der Tumor wird remodelliert. MCA-induzierte Sarkome aus RAG-2 defizienten oder wt Mäusen zeigten nach Transplantation in RAG-2 defiziente Empfänger die gleichen Wachstumskinetiken. In immunkompetenten Empfängern dagegen wuchsen 100% der Tumore aus wt Mäusen an, während 40% der Tumore aus immundefizienten Mäusen abgestoßen wurden (Shankaran et al. 2001). Entstehen Tumore in Abwesenheit eines intakten Immunsystems, zeigen sie eine höhere Immunogenität im Vergleich zu Tumoren aus immunkompetenten Organismen.

Der fließende Prozeß des Tumorwachstums und der Eliminierung von Tumoren oder deren Remodellierung durch das Immunsystem ist in Abb. 1.3 dargestellt. Die malignen Tumorzellen werden von Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems erkannt und vollständig eliminiert (Abb. 1.3A). Aufgrund der genetischen Instabilität der Tumorzellen

besteht der Tumor aus einem heterogenen Gemisch unterschiedlicher Tumorzellen. Die Entstehung neuer Tumorzell-Varianten und die Eliminierung durch das Immunsystem stehen in einem Gleichgewicht (Abb. 1.3B). Dies ist ein langer Prozeß und kann Monate bis Jahre andauern. Durch den immunologischen Druck werden Tumorzell-Varianten mit geringer Immunogenität bevorzugt, können der Elimination durch das Immunsystem entkommen und sich unkontrolliert verbreiten (Abb. 1.3C).

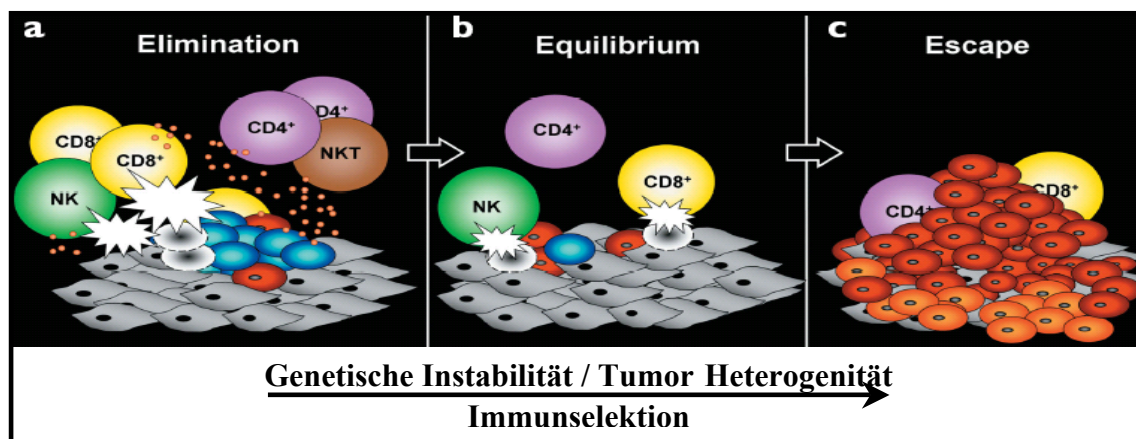


Abb. 1.3: „Cancer Immunoediting“

Das „Cancer Immunoediting“ kann in drei Phasen unterteilt werden. A: Immunzellen erkennen und eliminieren alle Tumorzellen (Elimination) oder B: einige Tumorzellen entgehen der Elimination. Neue Tumorzell-Varianten entstehen, die durch den Einfluß des Immunsystems modelliert werden (Equilibrium). C: Tumorzell-Varianten, die selektiv der Erkennung durch das Immunsystem entgehen, können unkontrolliert wachsen (Escape). Tumorzellen (blau), Tumorzell-Varianten (rot), nicht transformierte Zellen (grau), tote Tumorzellen (weiß/grau). Nach (Dunn et al. 2002).

Die „Escape“-Varianten zeigen oft Alterationen in der Antigen-Präsentation, z.B. reduzierte Expression von MHC Molekülen, Defekte bei der Antigen-Prozessierung, Verlust von Tumorantigen oder kompletten Verlust von MHC Genen, so dass diese Zellen nicht mehr von T-Zellen erkannt werden (Seliger et al. 2002; Yee et al. 2002). Tumorzellen können dem Immunsystem durch Resistenz gegenüber T-Zell-vermittelter Apoptose-Induktion und verringerter Suszeptibilität gegenüber TRAIL, FasL, und Perforin entkommen (Medema et al. 1999). Außerdem bewirken viele Tumore ein immunsuppressives Milieu im Tumor und umgebenden Stroma durch die Expression suppressiver Zytokine (Kiessling et al. 1999) oder durch die Attraktion von regulatorischen T-Zellen (Tregs), so dass Effektorzellen in ihrer Funktion gehemmt werden oder tolerant gegenüber den Tumorzellen werden.

1.1.3 Immuntherapie zur Behandlung von Tumoren

Die traditionelle Therapie von Tumoren beinhaltet die operative Entfernung des Tumors und der benachbarten Lymphknoten, oft in Verbindung mit einer Strahlentherapie. In der Chemotherapie werden den Patienten zytostatische und anti-angiogene Medikamente verabreicht, um die Vermehrung der Tumorzellen zu verhindern und das Wachstum von Blutgefäßen zur Tumorversorgung zu hemmen. Mit der Chemotherapie werden allerdings oft nicht alle Tumorzellen getötet und die Behandlung kann zu Nebenwirkungen, wie der Schädigung von Leber und Nieren sowie einem Abbau des Knochenmarks führen. Primärtumore können erst ab einer bestimmten Größe erkannt werden. Die Fähigkeit zur Metastasenbildung kann aber schon vorher etabliert sein. Zur erfolgreichen Behandlung von Krebs muß daher eine Therapie entwickelt werden, die nicht nur den Primärtumor bekämpft, sondern auch eventuelle Metastasen in anderen Regionen des Körpers.

Für eine erfolgreiche Immuntherapie von Krebspatienten muß die Toleranz des Immunsystems gegenüber dem Tumor gebrochen und eine tumorverwerfende Immunantwort induziert werden. Die Entwicklung immunologischer Tumortherapien basiert vor allem auf der Erkenntnis, dass maligne Zellen durch die Expression von Tumor-assoziierten Antigenen auf der Zelloberfläche sich von normalen Körperzellen unterscheiden und von Immunzellen erkannt werden können (van der Bruggen et al. 1991).

Zur Induktion einer immunologischen Antwort gegen Tumor-assoziierte Antigene wurden verschiedene Strategien entwickelt, wie die spezifische Vakzinierung mit Peptiden, Proteinen, DNA oder ganzen Tumorzellen. Zur Erstellung eines stärker immunogenen Antigens wurde das gp100 Melanozyten Differenzierungsantigen, welches als Tumorantigen auf Melanomzellen exprimiert wird, genetisch modifiziert (gp100₂₀₉₋₂₁₇ 210M) und als Tumorstoff in Kombination mit Interleukin-2 eingesetzt. In 30% der Melanompatienten wurde eine spezifische Immunantwort induziert (Rosenberg et al. 1998). Viele Strategien beruhen auf einem Transfer von mit Tumorantigenen gepulsten oder transduzierten Dendritischen Zellen, die als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APCs) den naiven T-Zellen die tumorassoziierten Peptide im richtigen Kontext *in vivo* präsentieren können (Engleman 2003). Die Vakzinierung mit Dendritischen Zellen, transfiziert mit Tumorantigen mRNA, führte zur Stimulation von Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen in Patienten mit Prostatakrebs (Heiser et al. 2002; Su et al. 2005). *In vitro* generierte tumorspezifische Lymphozyten werden durch adoptiven Transfer zur Tumorbekämpfung eingesetzt. MART-1 spezifische T-Zellklone wurden zusammen

mit einer niedrig dosierten IL-2 Therapie wiederholt Patienten mit metastasierendem Melanom injiziert (Yee et al. 2002). Eine Lokalisation der transferierten T-Zellen an Orten von Tumoren sowie eine antitumorale Reaktion wurde beobachtet, allerdings zeigten die T-Zellen nur eine kurze Lebensdauer.

Diese konventionellen Immuntherapien, die auf Vakzinierung mit Tumorantigenen oder Dendritischen Zellen sowie adoptivem Transfer von spezifischen Effektor-T-Zellen und Therapie mit Zytokinen und Chemokinen basieren, bleiben trotz klinischer Erfolge hinter den Erwartungen zurück. Neue Immuntherapien setzen daher neben diesen Verfahren auf Strategien zur Bekämpfung des immunsuppressiven Netzwerks des Tumors, um gehemmte Tumorantigen-spezifische Immunreaktionen wieder herzustellen. Regulatorische T-Zellen können durch anti-CD25 Antikörper depletiert werden oder durch Blockade von Foxp3 in der Differenzierung gestört werden. Außerdem können lösliche Faktoren wie TGF- β , IL-10 oder VEGF, die zum suppressiven Milieu des Tumors beitragen, blockiert werden. So wurde z.B. eine Verbesserung der DC-Vakzine induzierten Immunantwort in Patienten mit Prostatakrebs durch die Depletion von regulatorischen T-Zellen gezeigt (Dannull et al. 2005). Zur Etablierung starker tumorverwerfender Immunantworten durch immuntherapeutische Maßnahmen scheint die Kombination verschiedener Therapien, die zur Stimulation einer Immunantwort und zur Brechung bestehender Toleranzmechanismen führt, am erfolgversprechensten.

1.2 Interferone und deren Rolle bei der Immunüberwachung

Interferone (IFNs) sind eine Gruppe der Zytokine, die nach ihrer Fähigkeit benannt wurden, durch Stimulation der Synthese antiviraler Genprodukte mit der viralen Replikation zu interferieren und die Verbreitung der Viren zu behindern (Isaacs and Lindenmann 1957; Katze et al. 2002).

Entsprechend ihrer Sequenzhomologien sowie Rezeptorbindung werden Interferone in Klassen vom Typ I (IFN- α , - β , - δ , - ϵ , - κ , - τ , - ω), Typ II (IFN- γ) und Typ III (IFN- λ) eingeteilt (Platanias 2005). Typ I IFNs werden von vielen Zellen sekretiert, z.B. nach einer Virusinfektion. Sie können parakrin oder autokrin über Bindung an Interferon-alpha-Rezeptoren (IFNARs) wirken. IFN- γ wird von T-Zellen, NK-Zellen, NKT-Zellen und APCs produziert und vermittelt seine Wirkung über Bindung an den Interferon-gamma-Rezeptor (IFNGR). IFNARs und IFNGRs werden von den meisten Zellen auf der

Oberfläche exprimiert. Das IFN-Signal wird über intrazelluläre Signalwege weitergeleitet und bewirkt die Induktion Interferon-stimulierter Gene (ISGs). Die λ -IFNs der neu definierten Gruppe vom Typ III aktivieren einen Rezeptorkomplex bestehend aus IL-28R/IL-10R Ketten. Die Signale führen zur Induktion der gleichen ISGs wie durch Typ I IFN. Die IFN- λ Expression wurde in APCs, Hepatozyten, MEFs und einigen Tumorzelllinien nachgewiesen (Coccia et al. 2004; Siren et al. 2005; Onoguchi et al. 2007).

Neben der antiviralen Aktivität spielen Interferone auch während der Induktion und Regulation einer Immunantwort gegen Tumore eine Rolle. Durch die transkriptionelle Regulation relevanter Gene spielt IFN- γ bei vielen zellulären Effekten eine Rolle, wie bei der Erkennung von Pathogenen, der Antigenprozessierung/-presentation, der Induktion des antiviralen Status, der Inhibition der Proliferation, der Induktion der Apoptose, der Aktivierung antimikrobieller Effekte sowie bei der Immunmodulation, der Migration von Leukozyten und der Entwicklung von T-Zellen (Schroder et al. 2004). IFN- γ wird von tumorinfiltrierenden Lymphozyten wie NKT-, NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen gebildet, vermittelt deren Transaktivierung und trägt zur Eliminierung von Tumorzellen bei (Abb. 1.2). Endogenes IFN- γ schützte den Wirtsorganismus vor transplantierten sowie vor chemisch induzierten und spontanen Tumoren. Immunogene Fibrosarkome wuchsen schneller in Mäusen nach Neutralisierung mit anti-IFN- γ Antikörpern (Dighe et al. 1994). Mäuse mit Defekten des IFN- γ Signalweges, wie IFN- γ Rezeptor KO- (*Ifngr1^{-/-}*), Stat-1 KO- (*Stat-1^{-/-}*) oder IFN- γ KO- (*IFN- γ ^{-/-}*) Mäuse, waren 10-20 mal sensitiver gegenüber der tumorinduzierenden Wirkung von MCA im Vergleich zu wt Kontrollmäusen (Kaplan et al. 1998) (Street et al. 2001). IFN- γ KO-Mäuse (C57BL/6) wiesen ein erhöhtes Vorkommen an Lymphomen auf und IFN- γ KO-Mäuse (Balb/c) zeigten vermehrt Adenokarzinome in der Lunge (Street et al. 2002). RkSk-Mäuse (*RAG-2^{-/-} × Stat-1^{-/-}*) zeigten eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber MCA-induzierten Tumoren im Vergleich zu wt Kontrollmäusen (Shankaran et al. 2001).

Typ I Interferone können von nahezu allen Zellen produziert werden, große Mengen werden *in vivo* vor allem von plasmazytoiden Dendritischen Zellen sekretiert (Cella et al. 1999). Die Interferone IFN- α/β aktivieren Dendritische Zellen (Hoshino et al. 2002) sowie Makrophagen und NK-Zellen und erhöhen die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen durch Induktion von TRAIL (Sato et al. 2001). Die Effekte von Typ I IFNs auf T-Zellen sind gegensätzlich. So inhibierten Typ I IFNs die Proliferation naiver T-Zellen, während akti-

vierte T-Zellen dagegen resistent waren (Petricoin et al. 1997; Dondi et al. 2003). Die Proliferation von CD8⁺ T-Zellen wurde durch Typ I IFNs erhöht (Curtsinger et al. 2005) und aktivierte T-Zellen zeigten eine höhere Überlebensrate in Anwesenheit von Typ I IFNs (Lombardi et al. 2000). Eine antitumorale Immunreaktion wurde von Typ I IFNs durch Erhöhung der Überlebensrate tumorspezifischer CTLs hervorgerufen (Hiroishi et al. 2000). Andererseits führten Typ I IFNs zu einer erhöhten Sensitivität von T-Zellen gegenüber aktivierungsbedingtem Zelltod („Activation Induced Cell Death“, AICD) (Kaser et al. 1999).

Die Neutralisierung von IFN- α/β mit polyklonalen Antikörpern verstärkte das Wachstum von syngen Tumoren in Mäusen im Vergleich zu immunkompetenten Kontrollmäusen (Gresser et al. 1988). Endogenes IFN- α/β führte zur Abstoßung von MCA-induzierten Sarkomen in immunkompetenten Mäusen (Dunn et al. 2005).

Beim „Immunoediting“ von Krebs spielen daher nicht nur verschiedene Populationen von Lymphozyten eine Rolle, sondern auch die Interferone IFN- γ und IFN- α/β .

1.2.1 Die Interferon Regulatory Factor (IRF) Familie

Die Expression von Interferonen führt über intrazelluläre Signalkaskaden zur Induktion Interferon-stimulierte Gene (ISGs). Unter den Interferon-stimulierten Genen befinden sich einige „Interferon Regulatory Factors“ (IRFs), eine Familie von Transkriptionsfaktoren, die an vielen verschiedenen zellulären Prozessen wie z.B. der Pathogenabwehr, der Aktivierung des Immunsystems, der Regulation des Zellwachstums, der Suppression von Tumoren, der Regulation von Entzündungsprozessen und der Entwicklung und Reifung von hematopoetischen Zellen beteiligt sind. Die bisher bekannten zehn Mitglieder dieser Familie weisen ein Helix-Turn-Helix DNA-Bindemotiv mit fünf hoch konservierten Tryptophanresten am Aminoterminalende auf (Taniguchi et al. 2001), welches die Bindung an spezifische Sequenzen im Promotorbereich von Zielgenen ermöglicht. Die IRFs können als transkriptionelle Aktivatoren (IRF-1, IRF-2, IRF-3, IRF-9), Repressoren (IRF-8) oder auch bifunktional (IRF-4, IRF-7) wirken (Taniguchi, 1995). Neben den zellulären IRFs sind auch IRFs viralen Ursprungs (vIRFs) bekannt (Moore et al. 1996), die an zelluläre IRFs binden und deren transaktivierende Wirkung behindern (Gao et al. 1997; Zimring et al. 1998) oder durch Konkurrenz bei der Bindung an ISREs die Aktivierung von Transgenen verhindern.

1.2.2 Interferon Regulatory Factor-1 (IRF-1)

Der Transkriptionsfaktor IRF-1 wurde als erstes Mitglied der IRF Familie identifiziert und ursprünglich als DNA-bindendes Protein der Positive-Regulatory-Domain-I (PRDI) des humanen Interferon- β Promotors charakterisiert (Fujita et al. 1988).

IRF-1 ist in allen Zellen gering konstitutiv exprimiert und wird durch Zytokine, wie Interleukin-1 (IL-1), IL-6, Tumor Necrosis Factor- α (TNF α), Platelet-derived Growth Factor (PDGF) und Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF), Interferone, dsRNA, Viren und genotoxischem Stress induziert (Miyamoto et al. 1988; Fujita et al. 1989; Abdollahi et al. 1991; Kroger et al. 2002).

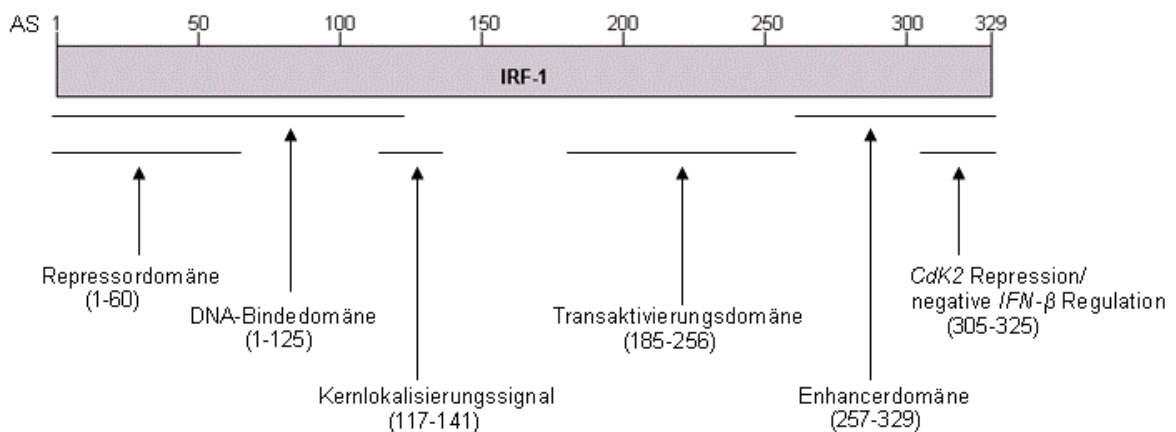


Abb. 1.4 Domänenstruktur des murinen IRF-1

Länge: 329 Aminosäuren (AS), Repressordomäne: 1-60, DNA-Bindedomäne: 1-125, Kernlokalisierungssignal: 117-141, Transaktivierungsdomäne: 185-256, Enhancerdomäne: 257-329, Cdk2 Repression/negative IFN- β Regulation: 305-325.

Das IRF-1 Protein, bestehend aus 329 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 37 kDa, weist eine Halbwertszeit von 0,5 h auf und ist im Kern lokalisiert. Verschiedene Domänen des IRF-1 Proteins sind charakterisiert, so befindet sich am N-Terminus die DNA-Bindedomäne und eine Repressordomäne (Abb. 1.4). Ein Kernlokalisierungssignal, eine Transaktivierungsdomäne und eine Enhancerdomäne sind ebenfalls identifiziert (Harada et al. 1989; Kirchhoff et al. 2000). Der Effekt der Transaktivierungsdomäne kann durch die Enhancerdomäne verstärkt werden, durch die Repressordomäne aber auch kom-

plett inhibiert werden. Diese Eigenschaften zeichnen IRF-1 als einen schwachen Transkriptionsaktivator aus (Kirchhoff et al. 2000).

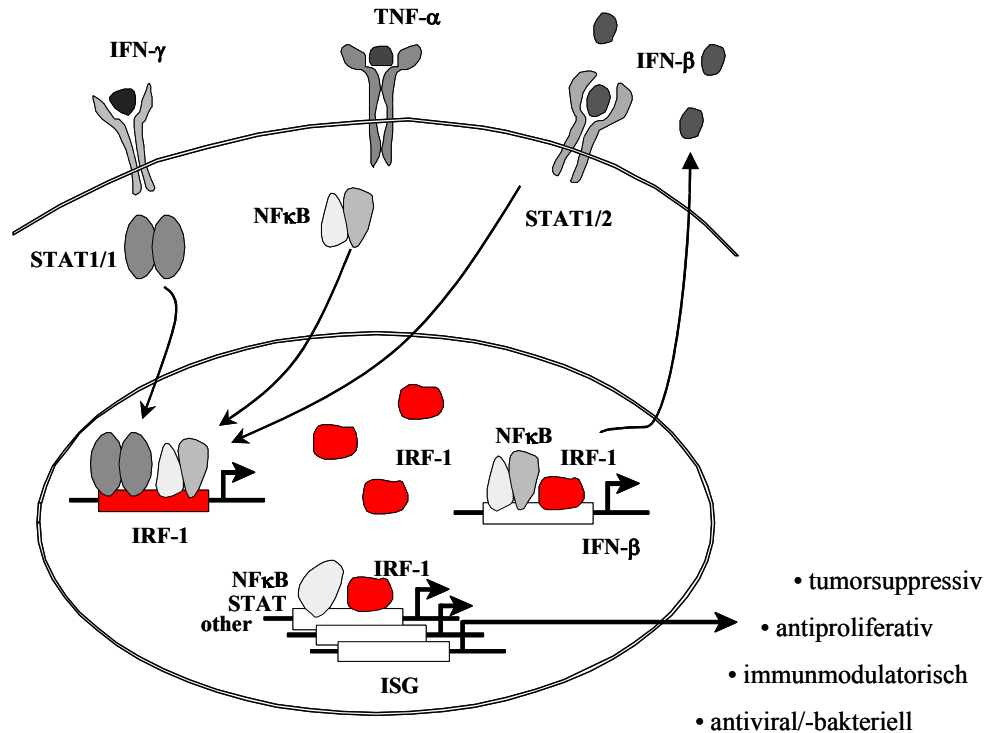


Abb. 1.5 Induktion und Aktivität von IRF-1

Die Transkription von IRF-1 wird durch verschiedene Stimuli, wie IFN-γ oder TNF-α, über intrazelluläre Signalwege mittels Transkriptionsfaktoren wie den Stats und NFκB induziert. IRF-1 bindet zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren an die Promotoren der ISGs und aktiviert deren Transkription. Die Expression von IRF-1 führt zu tumorsuppressiven, antiproliferativen, immunmodulatorischen und antiviralen/-bakteriellen Effekten. Verändert nach (Kroger et al. 2002).

Die transkriptionelle Geninduktion durch die sequenzspezifische DNA-Bindung an IRF-Elemente (IRF-E) mit der Konsensussequenz G(A)AAANNGAAA (Tanaka et al. 1993) in Promotorbereichen von Zielgenen ist die am besten charakterisierte Aktivität von IRF-1. Diese Sequenz überschneidet sich mit dem Motiv des „Interferon Stimulated Response Elements“ (ISRE), welches in vielen Promotoren Interferon-stimulierter Gene (ISGs) vorhanden ist (Kröger et al., 2002). Durch Homo- und Heterodimersierung mit anderen Transkriptionsfaktoren wie Stat1, bei deren gleichzeitiger Bindung oder durch die Rekrutierung von Histonacetylasen kann IRF-1 die Genexpression zusätzlich beeinflussen. So bindet IRF-1 z.B. an den IFN-β Promotor und induziert bei gleichzeitiger Bindung von NFκB an den Promotor die Transkription des IFN-β Gens (Kirchhoff et al. 1999). Die

IRF-1 vermittelte Induktion der Expression von Genen führt zu antiviralen/antibakteriellen, antiproliferativen, immunstimulatorischen und tumorsuppressiven Effekten (Abb. 1.5).

1.2.3 Tumorsuppressive und antiproliferative Eigenschaften von IRF-1

Der Verlust der IRF-1 Aktivität durch Mutationen oder Deletionen im IRF-1 Gen ist mit der Entwicklung und der Progression von Tumoren beim Menschen assoziiert, wie der Entstehung von Leukämien, dem Myelodysplastischen Syndrom (MDS), Brustkrebs und Tumoren des Magen- und Darmtrakts (Willman et al. 1993; Nozawa et al. 1998). IRF-1 wurde daher als Tumorsuppressor beschrieben. Neben Deletionen in der IRF-1 Region auf Chromosom 5q31.1 werden als Ursache des Verlusts der IRF-1 Aktivität auch verkürzte Spleißvarianten der IRF-1 mRNA (Harada et al. 1994) oder die Expression des inhibitorischen IRF-1-bindenden Faktors Nukleophosmin in leukämischen Zellen beschrieben (Kondo et al. 1997).

IRF-1 ist in der Lage, die IRF-2 vermittelte Transformation von NIH3T3 Zellen und deren Tumorbildung in Nacktmäusen zu revertieren (Harada et al. 1993). Die Expression von IRF-1 unterbindet das kontakt-unabhängige Wachstum von Zellen, die mit verschiedenen Onkogenen wie c-myc, c-fos, HER1, HER2 oder E1a/b transformiert wurden (Kirchhoff and Hauser 1999). Desweiteren führt die Expression von IRF-1 zu einer verlangsamten Proliferation und zu einem reduzierten kontakt-unabhängigen Wachstum von Sarkomzellen oder hepatozellulären Karzinomzellen *in vitro*, sowie deren reduzierter Tumorbildung in syngen Mäusen (Kroger et al. 2001).

Die Expression des c-HA-ras Gens ist ausreichend, um IRF-1^{-/-} MEFs zu transformieren (Tanaka et al. 1994). Die Transformation von wt MEFs erfordert dagegen die Expression von mindestens zwei Onkogenen. Desweiteren gehen IRF-1 exprimierende Zellen bei einer Überexpression des Onkogens c-HA-ras nach zellulärem Streß ausgelöst durch Serumentzug, Bestrahlung oder Zytostatika in die Apoptose, während IRF-1 defiziente Zellen bei gleichen Bedingungen keinen programmierten Zelltod zeigen (Tanaka et al. 1994). IRF-1 erhöht die Expression einer Reihe von Caspasen und des Fas Liganden, wodurch die Zelle bei zellulärem Streß und DNA Schädigung sensibler für apoptotische Signale wird.

Die Überexpression von IRF-1 führt zur Inhibition der Proliferation, was auf die Induktion der Transkription antiproliferativ wirkender Gene zurückzuführen ist (Kirchhoff et al. 1993). Die IRF-1 vermittelte Wirkung führt entweder zur Verlängerung der Zellzyklus-

phasen oder einem Arrest in der G1 Phase. Hervorgerufen wird dies u.a. durch die Cyclin-dependent Kinase cdk2, die 2'-5'-Oligoadenylatzyklase oder Zellzyklusinhibitoren wie p21. Durch Aktivierung der dsRNA-abhängigen Proteinkinase PKR wird außerdem die Translation inhibiert (Kirchhoff et al. 1995).

Mäuse, in denen das IRF-1 Gen deletiert ist, zeigen zwar keine erhöhte Entwicklungsrate spontaner Tumore, aber eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber der Transformation durch Onkogene. So zeigen p53/IRF-1 Doppelknockout-Mäuse oder IRF-1 KO-Mäuse, die das humane c-HA-ras Gen überexprimieren, eine signifikant gesteigerte Tumorzinzidenz sowie ein erweitertes Tumorspektrum (Nozawa et al. 1999).

1.2.4 Einfluß von IRF-1 auf das Immunsystem

In seiner Eigenschaft als Transkriptionsaktivator reguliert IRF-1 eine Vielzahl von Genen, die bei der Entwicklung und Funktion des angeborenen und des adaptiven Immunsystems eine Rolle spielen. IRF-1 induziert eine Reihe von Proteinen, die für die erste Abwehr von Viren benötigt werden und zur Etablierung des antiviralen Status von Zellen beitragen, wie IFN- β , PKR oder 2',5'-OAS (Kirchhoff et al. 1995). In Makrophagen reguliert IRF-1 die Expression der induzierten NO-Synthetase (iNOS), die durch Produktion von Stickstoffmonoxid die Zytotoxizität von Makrophagen gegenüber Tumorzellen, Bakterien und anderen Erregern vermittelt (Kamijo et al. 1994). Desweiteren induziert IRF-1 das „Low Molecular Weight Protein-2“ (LMP-2) und das „Transporter associated with Antigen Processing-1“ (TAP-1) Protein (White et al. 1996), die in den Transport und die Prozessierung von MHC Klasse I Peptiden involviert sind. Die Expression der MHC Klasse I Moleküle selbst wird auch durch IRF-1 erhöht.

Durch die Analyse des Immunsystems in IRF-1 KO Mäusen werden die Auswirkungen von IRF-1 auf die Entwicklung einzelner Subklassen von Lymphozyten sichtbar. IRF-1 KO Mäuse haben eine reduzierte Anzahl an reifen zytotoxischen T-Zellen (CTLs). IRF-1 reguliert die Genexpression während der Entwicklung von Thymozyten, die für die Entwicklung und Differenzierung von CTLs eine Rolle spielen (Penninger et al. 1997). Außerdem zeigen IRF-1 KO Mäuse Mängel in der Beladung und Expression von MHC Klasse I Molekülen, die auf der verringerten Expression von LMP-2, TAP-1 und MHC Klasse I basieren (White et al. 1996) und zu Defekten bei den MHC Klasse I restringierten CTLs beitragen.

Die T-Helferzellen zeigen auf den ersten Blick ein normales Niveau in IRF-1 KO Mäusen. IRF-1 nimmt allerdings Einfluß auf die weitere Differenzierung von T-Helferzellen zu Th1- oder Th2-Zellen. IRF-1 reguliert die Expression der IL-12 p40 Untereinheit und des IL-12 Rezeptors. Da IL-12 essentiell für die Differenzierung von Th1-Zellen ist, zeigen T-Zellen aus IRF-1 KO Mäusen keine Entwicklung von Th1-Zellen, sondern ausschließlich eine Differenzierung zu Th2-Zellen. Dieser Defekt beruht vor allem auf der gestörten Produktion von IL-12 durch Makrophagen (Taki et al. 1997). Dementsprechend zeigen IRF-1 KO Mäuse eine höhere Suszeptibilität gegenüber Infektionen, die normalerweise von Th1-Zellen kontrolliert werden, wie z.B. Infektionen mit *Listeria monocytogenes* oder *Leishmania major*. Auf der anderen Seite sind die Mäuse gegenüber Infektionen mit *Nippostrongylus brasiliensis*, die von Th2-Zellen bekämpft werden, resistenter als wt Mäuse (Lohoff et al. 1997; Taki et al. 1997).

Desweiteren zeigen IRF-1 KO Mäuse reduzierte Werte an Natural Killer (NK) Zellen in Milz und Leber (Taki et al. 1997), was mit einem Verlust der NK-Zellfunktion einhergeht. Die Stammzellen im Knochenmark von IRF-1 KO Mäusen sind nicht beeinflusst, so können diese Zellen nach Transplantation in wt Mäuse funktionelle NK-Zellen generieren. Die Reduktion der NK-Zellen ist auf einen Defekt in der IL-15 Expression der Stromazellen im Knochenmark von IRF-1 KO Mäusen zurückzuführen, in Anwesenheit von IL-15 können IRF-1 KO Stammzellen funktionelle NK-Zellen generieren. Die Transkription von IL-15 wird durch IRF-1 reguliert (Ohteki et al. 1998). Die IL-15 abhängigen NKT-Zellen sind in IRF-1 KO Mäusen ebenfalls stark reduziert.

1.3 Aufgabenstellung

IRF-1 hat das Potential die Tumorbildung über verschiedene Mechanismen zu verhindern und ist deshalb ein interessantes Target. Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der tumorsuppressiven Mechanismen. Dabei sollte der Einfluß der intrinsischen und systemischen IRF-1 Effekte auf das Wachstum von Tumoren *in vivo* und das Potential von IRF-1 als Target einer Tumorthherapie erforscht werden.

[I] Die Expression von IRF-1 führt zur Inhibition der Proliferation und zur Reversion der Transformation (Harada et al. 1993; Kirchhoff et al. 1993). Um die Universalität der IRF-1 Wirkung im Maustumormodell zu zeigen, sollte die Wirkung von IRF-1 in der Kolonkarzinom-Zelllinie CT26 untersucht werden. Zur Analyse der IRF-1 vermittelten Effekte ist die regulierte Expression von IRF-1 essentiell. Aufgrund der antiproliferativen Wirkung ist die Selektion stabiler Klone nicht möglich (Kirchhoff et al. 1993), daher sollte IRF-1 konditional induzierbar unter der Kontrolle des Tetrazyklin-abhängigen Promotors exprimiert werden.

[II] IRF-1 induziert die Sekretion von IFN- β und erhöht die MHC Klasse I Expression (Chang et al. 1992; Kirchhoff et al. 1999). Es sollte ermittelt werden, welchen Einfluss IRF-1 auf die Erkennung von Tumorzellen durch spezifische Lymphozyten und die Attraktion von Immunzellen ausübt.

[III] Die IRF-1 Expression kann zur Induktion einer Immunreaktion führen (Kroger et al. 2001). Es sollte geprüft werden, ob IRF-1 im CT26 Modell eine spezifische Immunantwort induzieren kann. Durch Tumorwachstumsstudien in immundefizienten Mäusen sollte gezeigt werden, ob intrinsische IRF-1 Effekte ausreichen, um das Wachstum von Tumoren *in vivo* zu beeinflussen, oder ob ein funktionelles Immunsystem in syngen immunkompetenten Mäusen eine Reduktion des Tumors induzieren kann.

[IV] Bei Induktion einer Immunreaktion in syngen Mäusen sollte kontrolliert werden, ob es sich um eine protektive Immunantwort handelt, die Schutz vor erneutem „Tumorchallenge“ bietet.

[V] Ein möglicher Therapieansatz wäre die Einbringung von IRF-1 in etablierte Tumore *in vivo* mittels Gentransfer. Es sollte daher untersucht werden, ob IRF-1 das Wachstum eines bereits bestehenden Tumors beeinflussen kann. Außerdem sollte evaluiert werden, wie hoch der Anteil IRF-1 exprimierender Zellen im Tumor sein muß, um eine antitumorale Reaktion auszulösen, da durch Gentransfer *in vivo* nicht alle Zellen erreicht werden können.

2 Ergebnisse

Im Vorfeld dieser Arbeit war bekannt, dass IRF-1 seine tumorsuppressiven Eigenschaften über verschiedene Mechanismen vermittelt; zum einen über intrinsische Effekte, die zu einer Inhibition der Proliferation der Tumorzellen führen, zum anderen über systemische Effekte, die die Aktivierung des Immunsystems in Anspruch nehmen. Entsprechend der Zielstellung dieser Arbeit wurde die Charakterisierung der Wirkungsmechanismen von IRF-1 auf das Tumorstadium *in vitro* und *in vivo* untersucht. Der Schwerpunkt der Arbeiten lag auf der Etablierung eines neuen Systems zur konditionalen IRF-1 Expression in Tumorzellen. Dies ermöglichte die Charakterisierung der phänotypischen Eigenschaften der IRF-1 Expression im Tier und die Analyse der immunologischen Antworten.

Eine konstitutiv stabile Expression von IRF-1 ist aufgrund der wachstumsinhibitorischen Effekte nicht möglich (Kirchhoff et al. 1993). Für diese Arbeit wurde daher IRF-1 konditionell aktivierbar bzw. induzierbar in verschiedenen Tumorzelllinien exprimiert. Hierzu wurden verschiedene Systeme verwendet. Übernommen wurde ein etabliertes System, in dem die IRF-1-Aktivität posttranskriptionell über ein Östrogen-aktivierbares Fusionsprotein bestehend aus IRF-1 und der Hormonbindedomäne des humanen Östrogenrezeptors reguliert wird (Kirchhoff et al. 1993). Dieses System stellte sich als unbefriedigend für *in vivo* Versuche heraus. Deshalb wurde ein anderer Mechanismus zur Regulation von IRF-1 verwendet. Er basiert auf dem von Bujard und Kollegen etablierten Tet-System, bei dem die Transkription von IRF-1 Ligand-abhängig regulierbar ist (Gossen and Bujard 1992). Mit Hilfe der neu hergestellten stabilen Tumorzellklone, in denen die IRF-1 Aktivität oder die Transkription von IRF-1 konditionell regulierbar ist, wurden die IRF-1 vermittelten Effekte charakterisiert.

Zur Analyse der intrinsischen Effekte wurde die Reversion der Transformation und die Inhibition der Proliferation nach Induktion der IRF-1 Expression in Tumorzellen in Zellkultur untersucht. Diese bereits bekannten IRF-1 Effekte, sowie die Induktion von MHC Klasse I Molekülen und IFN- β , konnten für die hergestellten Tumorzellklone TS/AIH und CT26HA-IRF1 validiert werden. In weiterführenden Versuchen wurden Zytokine und Chemokine auf ein verändertes Expressionsmuster nach IRF-1 Expression analysiert, um einen möglichen Einfluß von IRF-1 auf die Erkennung von Tumorzellen durch spezifische T-Zellen oder deren Attraktion zu den Tumorzellen zu erforschen. Die Wirkung von IRF-1 auf das Wachstum von Tumoren in immundefizienten Nacktmäusen

da seine reaktiven Klasse I und Klasse II Peptide bekannt sind und anti-HA TCR transgene Mäuse verfügbar sind. Die Mehrzahl der CD8⁺ T-Zellen aus CL4 Mäusen (Morgan et al. 1996) tragen einen TCR spezifisch für das Peptid PR/8 HA (533-541) präsentiert von H-2K^d MHC Klasse I Molekülen. CD4⁺ T-Zellen aus HNT Mäusen (Scott et al. 1994) erkennen das Peptid PR/8 HA (126-138) präsentiert von I-A^d MHC Klasse II Molekülen. Diese Mäuse können u.a. als Quelle für HA-TCR spezifische T-Zellen dienen. In dieser Arbeit wurden CD8⁺ T-Zellen aus CL4 Mäusen für Analysen verwendet.

2.1.1 Regulation der IRF-1 Aktivität im IRF-1hER Fusionsprotein

Zur Charakterisierung von wachstumsinhibitorischen Genprodukten wie IRF-1 ist es notwendig, eine regulierbare Expression oder Aktivität des Transgens in den Zellen zu etablieren. Im Steroidrezeptor-System wird das Transgen mit der Hormonbindedomäne eines Steroidrezeptors fusioniert, wodurch die Genaktivität posttranskriptionell regulierbar ist (Picard 1993). Durch Anwendung eines Fusionsproteins aus IRF-1 und der Hormonbindedomäne des humanen Östrogenrezeptors (hER) kann die IRF-1 Aktivität Ligandabhängig graduell reguliert werden (Kirchhoff et al. 1993). In Abwesenheit von Rezeptoragonisten liegt das Fusionsprotein inaktiv in der Zelle vor. Nach Behandlung mit bestimmten Östrogenen kommt es zu einer Aktivierung von IRF-1hER. Der Transkriptionsfaktor IRF-1 kann nun seinerseits die Transkription seiner Zielgene (u.a. Interferon-Stimulated Genes, ISGs) induzieren. Der Mechanismus der Aktivierung von Steroidrezeptorfusionsproteinen ist weitgehend aufgeklärt. Das Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) bindet an das Fusionsprotein und reprimiert so den Komplex. Durch die Bindung von Östradiol unterläuft das Protein eine Konformationsänderung, Hsp90 verliert seine Affinität und das Fusionsprotein wird aktiv (Abb.2.1B).

Das Östrogen-aktivierbare System war bereits etabliert und wurde übernommen (Kirchhoff et al. 1993; Kirchhoff et al. 1999; Kroger et al. 2001). Es wurden stabile TSA Klone hergestellt, die das Fusionsprotein IRF-1hER konstitutiv unter der Kontrolle eines Säugerzellpromotors (MT7) exprimieren (Abb. 2.1A). Die Expression von IRF-1hER in TS/AIH Zellen wurde im Western Blot nachgewiesen (Abb. 2.1C).

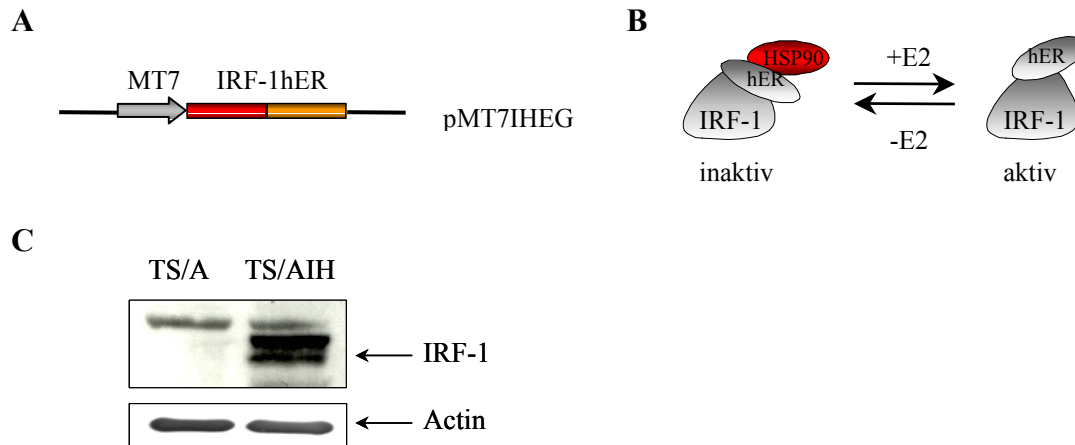


Abb. 2.1 Regulation der IRF-1 Aktivität im IRF-1-hER Fusionsprotein

A: Schematische Darstellung des IRF-1hER-Expressionskonstrukts. MT7: MT7-Promotor; IRF-1hER: Fusionsprotein aus murinem IRF-1 und der Bindedomäne des humanen Östrogenrezeptors. B: Schematische Darstellung der Aktivierung des Fusionsproteins durch Östrogen. Im inaktiven Zustand bindet HSP90 an das Fusionsprotein, durch Zugabe von Östrogen (+E2) wird das Protein aktiviert; in Abwesenheit von Östrogen (-E2) liegt das Protein im inaktiven Zustand vor. C: Nachweis des IRF-1hER Fusionsproteins im Western Blot. Zellysate von Wildtyp TS/A Zellen und TS/A Zellen, die stabil das IRF-1 hER Fusionsprotein exprimierten (TS/AIH), wurden mittels SDS-Page aufgetrennt. Das IRF-1hER Protein wurde im Western Blot mit anti-Östrogenrezeptor Antikörper nachgewiesen, zum Abgleich der Proteinmenge wurde β -Aktin nachgewiesen.

2.1.2 Tetrazyklin-abhängige Regulation der IRF-1 Expression

Ein alternatives System zur regulierbaren Expression basiert auf den Komponenten des Tetrazyklin-Resistenz-Operons aus *E. coli* (Gossen and Bujard 1992). In dieser Arbeit wurde IRF-1 strikt reguliert unter Kontrolle eines Tet-abhängigen Promotors in Tumorzellen exprimiert. Die Einführung dieses Systems war notwendig, da das Östrogen-System sich als nicht befriedigend in den *in vivo* Experimenten erwies.

Im TetOn-System bindet der reverse Transaktivator (rtTA), bestehend aus einer Tetrazyklin-Repressor-Domäne fusioniert mit der transkriptionsaktivierenden Domäne VP16 des Herpes Simplex Virus, an einen Minimalpromotor (P_{min}) mit spezifischen Tet-Operatorsequenzen (TetO) und initiiert die Transkription, wenn Doxyzyklin (Dox) an rtTA gebunden ist. Durch Wegnahme von Doxyzyklin verändert der Transaktivator seine Konformation, dissoziiert vom Promotor und die Transkription wird gestoppt (Abb. 2.2A). Allerdings wurde eine basale Aktivität des Promotors („Leaky System“) für verschiedene Transgene nachgewiesen (Rendahl et al. 1998; Mano et al. 2000).

Das Tet-System wurde bereits zur induzierbaren Expression von IRF-1 verwendet (Kirchhoff et al. 1995). Aufgrund der Basalaktivität des Promotors konnte nur eine geringe

Anzahl von Klonen generiert werden, die eine geringe Transgenexpression aufwiesen. Zur Minimierung der Basalaktivität des Promotors wurde in dieser Arbeit der Krab-Repressor verwendet, ein durch die Fusion der TetR Domäne mit der KRAB Domäne (Krüppel-associated box) des humanen Zinkfinger Proteins Kox1 entstandener Transrepressor (Deuschle et al. 1995). In Abwesenheit von Doxyzyklin bindet der Krab-Repressor an den Promotor und minimiert die Basalaktivität, bei Anwesenheit von Doxyzyklin bindet der reverse Transaktivator und initiiert die Transkription (Abb. 2.2A).

Der Krab-Repressor und der reverse Transaktivator wurden bicistronisch unter der Kontrolle des CMV-Promotors (pJSKRABrtTA) konstitutiv exprimiert (Abb. 2.2B).

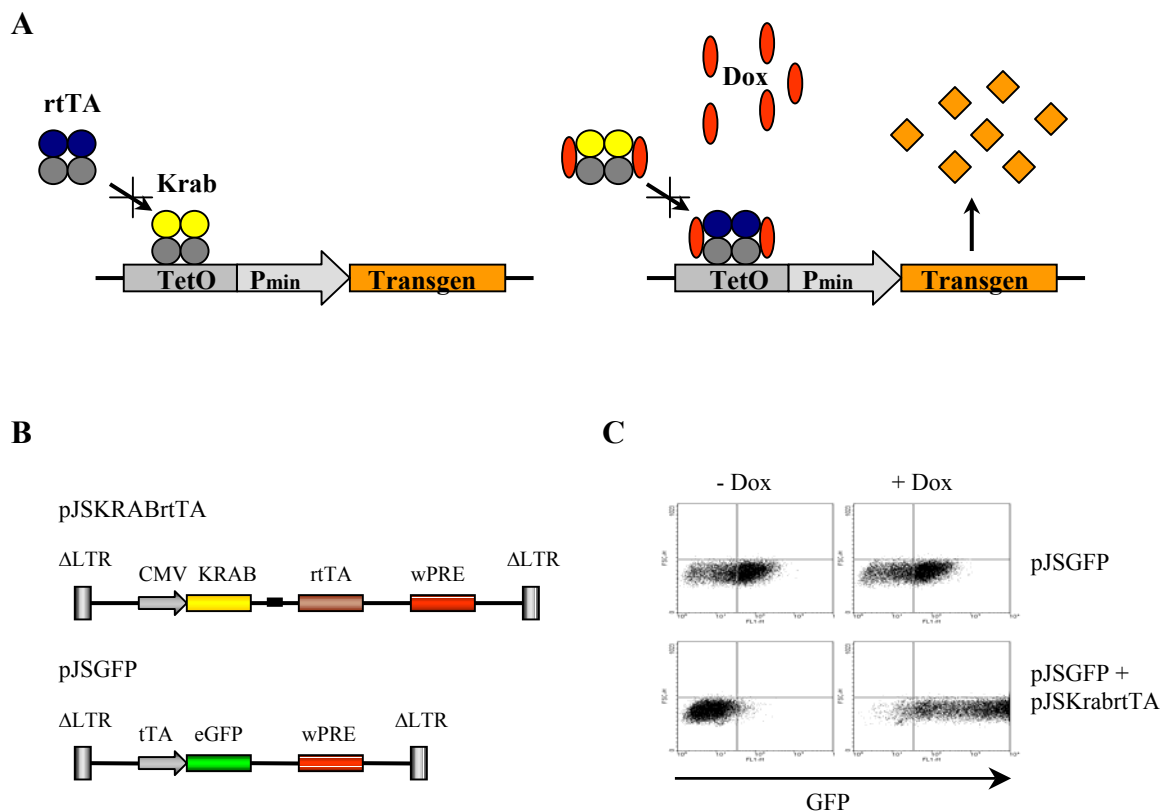


Abb. 2.2 Regulation der Transgen Expression im Tet-On System

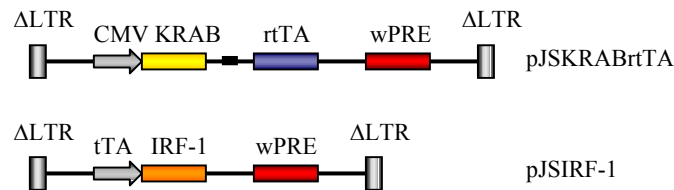
A: Schematische Darstellung der transkriptionellen Regulation im TetOn System mit dem Krab-Repressor. Ohne Doxyzyklin kann der reverse Transaktivator nicht an den Operator (TetO) binden; der Krab-Repressor bindet und unterdrückt die Basalaktivität. Durch Bindung von Doxyzyklin an den Krab-Repressor wird dieser inaktiviert und kann nicht mehr an den TetO binden. Der Transaktivator hingegen wird durch die Bindung von Doxyzyklin aktiv, bindet an den TetO und ermöglicht die Transkription des Transgens. B: Schematische Darstellung der lentiviralen Konstrukte. CMV: Cytomegalovirus Promotor (konstitutiv), tTA: Tetrazyklin-regulierter Promotor, KRAB: Krab-Repressor, ■: Internal Ribosomal Entry Site (IRES), rtTA: reverser Transaktivator, wPRE: woodchuck PRE-Element (Translationsverstärker), eGFP: enhanced green fluorescent protein, ΔLTR: selbstinaktivierendes long terminal repeat C: FACS Analyse der Expressionsregulation der lentiviralen Konstrukte. -Dox: reprimierter tTA Promotor, +Dox (2 µg/ml): aktivierter tTA Promotor.

Um die Wirkung des KRAB-Repressors und des reversen Transaktivators auf die Regulation des Tet-Promotors zu untersuchen, wurde ein Konstrukt mit eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) unter Kontrolle des Tet-Promotors hergestellt (pJSGFP). Die Funktionalität des reversen Transaktivators und des Krab-Repressors wurde in infizierten Zellen durch FACS-Analysen untersucht. Hierbei wurde die Expression von eGFP unter Kontrolle des Tet-Promotors in An- und Abwesenheit von Doxyzyklin gemessen (Abb. 2.2C). Es konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von rtTA und KRAB eine hohe Expression von eGFP vorlag, die durch Dox nicht beeinflusst wurde. In Anwesenheit von rtTA und KRAB ohne Dox wurde die Basalaktivität reduziert. Nach Stimulation mit Dox wurde eine hohe Induktion der eGFP Expression gemessen. Es konnte somit gezeigt werden, dass eine hohe Induzierbarkeit der Transgenexpression bei reduzierter Basalaktivität erreicht wurde und sich dieses System daher gut zur regulierten Expression von Transgenen eignet. Durch Verwendung von lentiviralen Konstrukten konnte außerdem eine hohe Infektionsrate von Tumorzellen erreicht werden.

Zur Herstellung von CT26HA Zellen, die IRF-1 strikt Doxyzyklin-abhängig exprimieren, wurden die Zellen in zwei Schritten verändert (Abb. 2.3A). Zunächst wurden die Zellen mit Viren infiziert, die den KRAB Repressor und den reversen Transaktivator exprimieren (pJSKRABrtTA). Zellklone, die eine strikte Regulierbarkeit von tTA-abhängigen Promotoren aufwiesen, wurden ausgewählt und mit dem IRF-1 Expressionskonstrukt unter der Kontrolle des tTA-Promotors infiziert (pJSIRF-1). Stabile Zellklone wurden selektiert und auf die Expression von IRF-1 untersucht. Um die Höhe der Dox-induzierten IRF-1 Expression mit der durch IFN- γ , dem stärksten Induktor von IRF-1, induzierten Expression zu vergleichen, wurden CT26HA wt Zellen und CT26HA-IRF1 Zellen mit Dox, mit IFN- γ oder ohne Zusatz inkubiert und das IRF-1 Protein durch Western Blot Analyse nachgewiesen (Abb. 2.3B). In den CT26HA wt Zellen war durch Doxyzyklin keine Induktion zu beobachten, IFN- γ dagegen induzierte eine starke IRF-1 Expression. Die CT26HA-IRF1 Zellen zeigten keine Basalexpression des Transgens. Die Expression von IRF-1 wurde in diesen Zellen durch Doxyzyklin ähnlich hoch induziert wie durch IFN- γ . Die durch Dox induzierte Bande lief im Blot etwas höher, da das transfizierte IRF-1 einen HA-Tag besitzt. Das TetOn-System kombiniert mit dem KRAB-Repressor erwies sich also als sehr gutes System zur strikten Regulation der Expression von IRF-1 in Tumorzellen.

Ein Teil dieser Experimente wurde zusammen mit Viola Wöckel im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt und ist daher in beiden Arbeiten beschrieben.

A



B

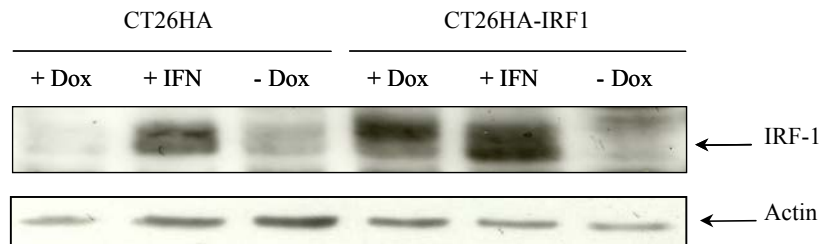


Abb. 2.3 Regulation der IRF-1 Expression in Tumorzellen

A: Schematische Darstellung der Lentiviralen Expressionskonstrukte zur Transduktion von Tumorzellen (Abkürzungen s. Abb. 2.2) B: Nachweis des IRF-1 Proteins im Western Blot. CT26HA Zellen und CT26HA-IRF1 Zellen wurden 48h ohne (- Dox), mit 2 µg/ml Doxyzyklin (+ Dox) oder mit 500 units/ml IFN-γ (+ IFN) kultiviert und die Zelllysate mittels SDS-Page aufgetrennt. Das IRF-1 Protein wurde im Western Blot mit anti-IRF-1 Antikörper nachgewiesen. Zum Abgleich der Proteinmenge wurde β-Aktin nachgewiesen.

2.2 Veränderung des Phänotyps durch Expression von IRF-1 in Tumorzellen

Die Expression von IRF-1 hat direkte Auswirkungen auf die Tumorzellen selbst. Die konditional induzierbare Aktivität bzw. Expression von IRF-1 in den TS/AIH und CT26HA-IRF1 Zellen erlaubte eine genaue Untersuchung dieser IRF-1-vermittelten Effekte.

2.2.1 Proliferation und die Koloniebildung

Die Überexpression von IRF-1 inhibiert das Zellwachstum (Kirchhoff et al. 1993). Dieser Effekt ist in Zellen, die durch die Expression von Onkogenen transformiert wurden, noch verstärkt. Es sollte untersucht werden, ob IRF-1 das Wachstum etablierter Tumorzelllinien, die von Tumoren aus Mäusen abstammen, beeinflusst. Die Wirkung von IRF-1 auf das Wachstum der Tumorzellen wurde in einem WST-Assay bestimmt. Dieser basiert auf der Messung der metabolischen Aktivität der Zellen und kann mit der Zellproliferation gleich-

gesetzt werden. In den Tumorzellen wurde IRF-1 für sieben Tage induziert bzw. aktiviert und im Anschluß ein WST-Assay durchgeführt. Bei mikroskopischer Betrachtung konnte eine niedrigere Proliferation IRF-1 exprimierender Zellen beobachtet werden.

Die Behandlung der wt TS/A und CT26HA Zellen zeigte, dass Östradiol oder Doxyzyklin keinen Einfluss auf die metabolische Aktivität haben (Abb. 2.4 A/B, linke Graphik). Die IRF-1-vermittelte Inhibition der Proliferation war in beiden Zelllinien deutlich messbar. Die Aktivierung von IRF-1 in TS/AIH Zellen reduzierte die metabolische Aktivität um 50% gegenüber nicht behandelten Zellen (Abb. 2.4A). Die Induktion von IRF-1 in CT26HA-IRF1 Zellen reduzierte die metabolische Aktivität um 70% (Abb. 2.4B). Die Aktivierung bzw. die Induktion von IRF-1 führt in den beiden getesteten Tumorzelllinien zu einer starken Inhibition der Proliferation.

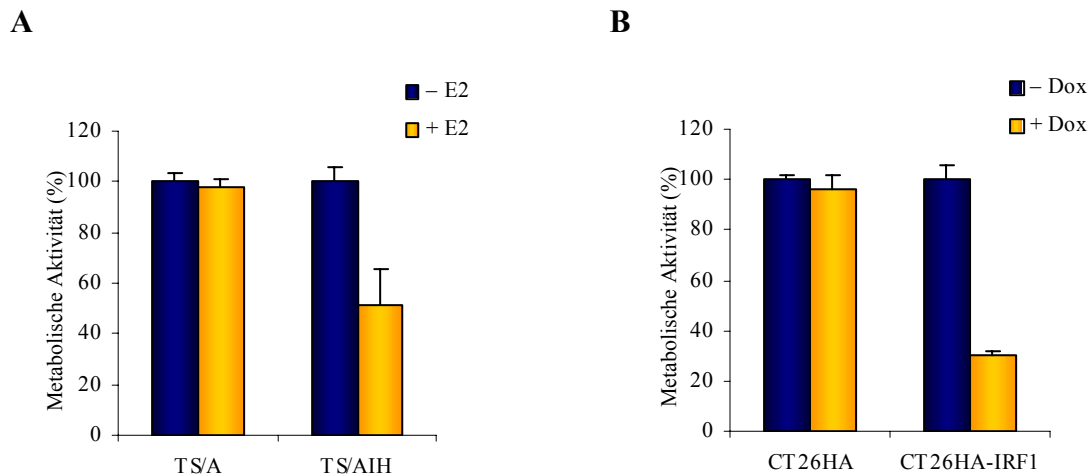


Abb. 2.4 Einfluß von IRF-1 auf die metabolische Aktivität von TS/A und CT26HA Tumorzellen

IRF-1 exprimierende Zellen und deren Parentalzellen wurden ausgesät und IRF-1 für sieben Tage aktiviert bzw. induziert. Die metabolische Aktivität wurde im WST-Assay bestimmt und der Wert für die jeweils unstimulierten Zellen gleich 100% gesetzt. A: TS/A Zellen und TS/AIH Zellen wurden sieben Tage ohne (- E2) oder mit 1µM Östrogen (+ E2) im Medium kultiviert. B: CT26HA Zellen und CT26HA-IRF1 Zellen wurden sieben Tage ohne (- Dox) oder mit 2 µg/ml Doxyzyklin (+ Dox) kultiviert.

Vereinzelte proliferierende Zellen bilden Kolonien aus. Es sollte untersucht werden, ob die Aktivierung oder Expression von IRF-1 die Koloniebildung beeinflusst. Die Zellen wurden dünn ausplattiert und für 14 Tage ohne oder mit β -Östradiol zur Aktivierung bzw. Doxyzyklin zur Expression von IRF-1 inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden mit Kristallviolett angefärbt und gezählt. Die parentalen Tumorzellen zeigten die gleiche Kolonienanzahl im stimulierten Zustand wie im nicht stimulierten Zustand, d.h. Östradiol

oder Doxyzyklin hatten keinen Einfluß auf die Koloniebildung. Die TS/AIH Zellen zeigten weniger Koloniebildung als die wt TS/A Zellen. Die Kolonienanzahl verringerte sich durch Aktivierung von IRF-1 in den TS/AIH Zellen um 57% im Vergleich zu Zellen, in denen IRF-1 nicht aktiviert wurde (Abb. 2.5A). Durch Expression von IRF-1 in den CT26HA-IRF1 Zellen sank die Kolonienanzahl um 79% (Abb. 2.5B). Die Anzahl der Kolonien in der Zellkultur mit IRF-1 exprimierenden Zellen stieg auch nach längerer Beobachtungszeit (4 Wochen) nicht an. Die Aktivierung bzw. die Induktion von IRF-1 führt in den beiden getesteten Tumorzelllinien zu einer starken Reduktion der Koloniebildung.

Die Ergebnisse zeigen, dass IRF-1 sowohl die Proliferation als auch die Koloniebildung in beiden Tumorzelllinien inhibiert.

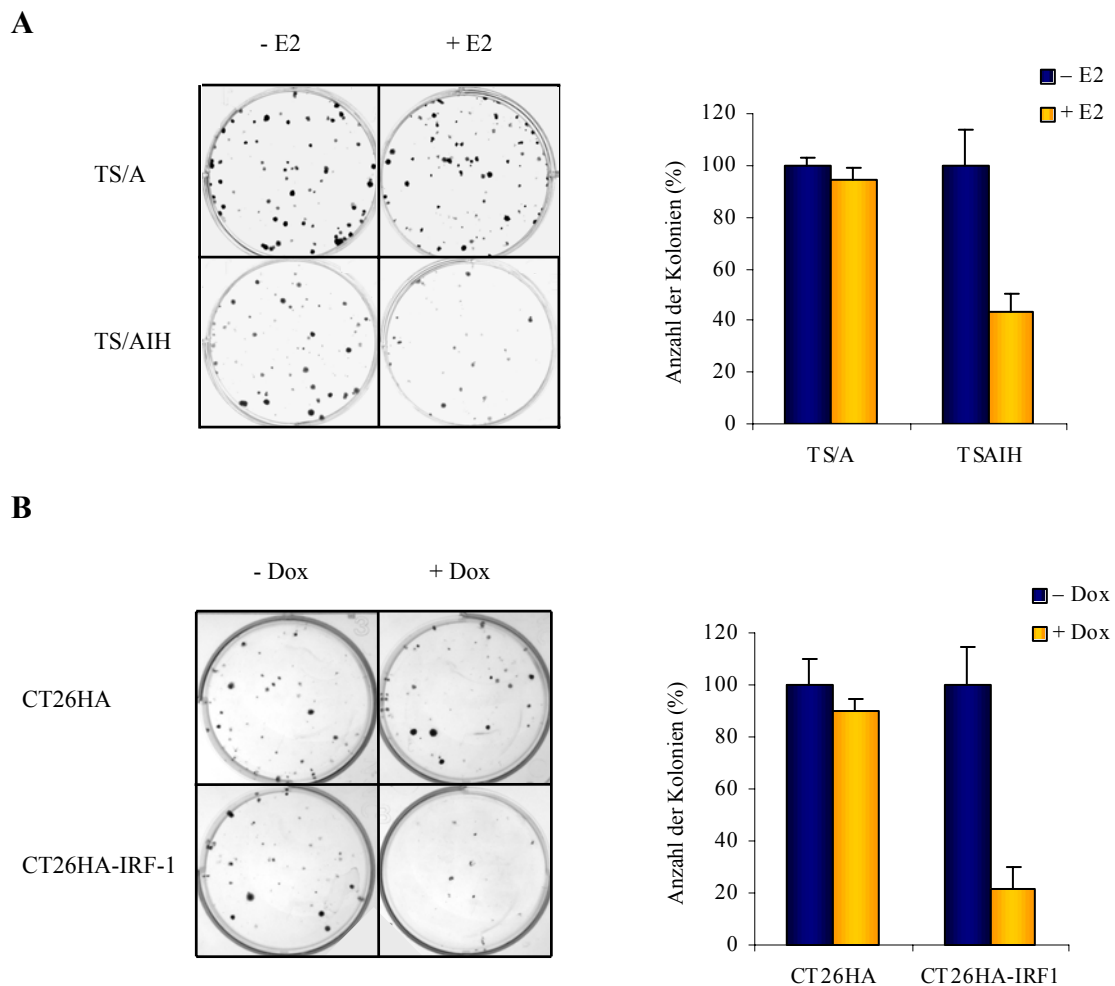


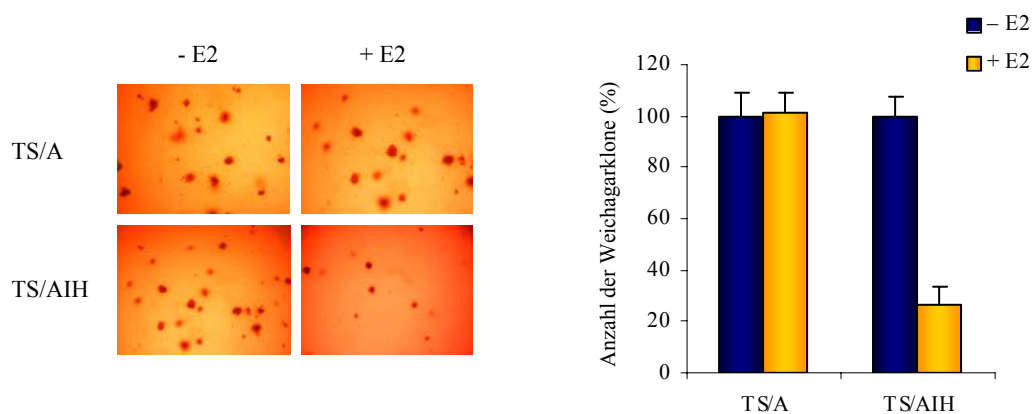
Abb. 2.5 Einfluß von IRF-1 auf die Koloniebildung von TS/A und CT26HA Tumorzellen

IRF-1 exprimierende Zellen und deren Parentalzellen wurden dünn ausgesät (150 Zellen/6well) und IRF-1 für 14 Tage aktiviert bzw. induziert. Die Zellen wurden mit Kristallviolett gefärbt und die Kolonien gezählt. Der Wert für die jeweils unstimulierten Zellen wurde gleich 100% gesetzt. A: TS/A Zellen und TS/AIH Zellen wurden 14 Tage ohne (- E2) oder mit 1µM Östrogen (+ E2) im Medium kultiviert. B: CT26HA Zellen und CT26HA-IRF1 Zellen wurden 14 Tage ohne (- Dox) oder mit 2 µg/ml Doxyzyklin (+ Dox) kultiviert.

2.2.2 Reversion des onkogenen Phänotyps durch IRF-1

Ein wichtiges Merkmal onkogen transformierter Zellen ist die Fähigkeit, ohne Kontakt zur Zellkulturschale zu wachsen. Diese Fähigkeit ermöglicht es Tumorzellen in Weichagar Kolonien zu bilden, während nicht-transformierte Zellen diese Eigenschaft nicht aufweisen. Zur Untersuchung der Kolonienbildung wurden die Zellen für zehn Tage in 0,3%igem Weichagar ausgesät und in An- oder Abwesenheit von β -Östradiol oder Doxyzyklin kultiviert. Die Anzahl sowie die Größe der Kolonien wurde im Lichtmikroskop untersucht.

A



B

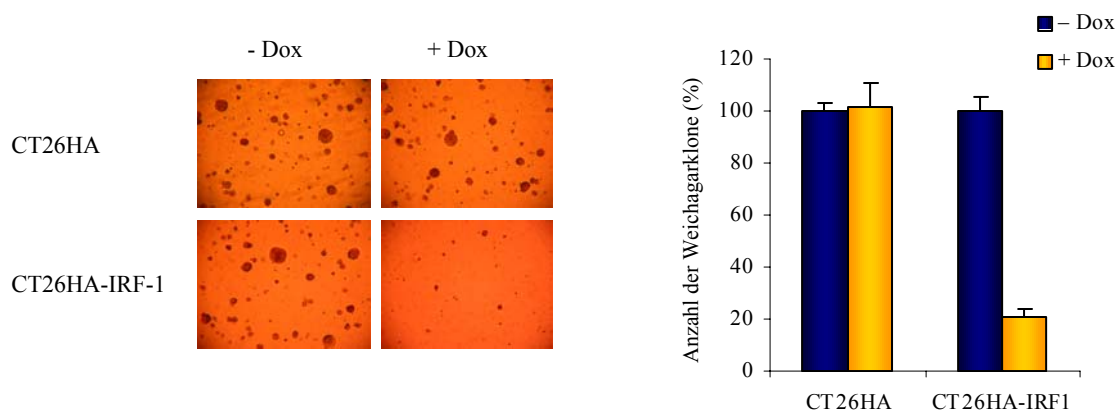


Abb. 2.6 Einfluß von IRF-1 auf den onkogenen Phänotyp von TS/A und CT26HA Tumorzellen

IRF-1 exprimierende Zellen und deren Parentalzellen wurden in Weichagar ausgesät und IRF-1 für zehn Tage aktiviert bzw. induziert. Die Bildung von Weichagarkolonien wurde im Lichtmikroskop untersucht und die Anzahl sowie die Größe der Kolonien bestimmt. Der Wert für die jeweils unstimulierten Zellen wurde gleich 100% gesetzt. A: TS/A Zellen und TS/AIH Zellen wurden 10 Tage ohne (- E2) oder mit 1 μ M Östrogen (+ E2) kultiviert. B: CT26HA Zellen und CT26HA-IRF1 Zellen wurden 10 Tage ohne (- Dox) oder mit 2 μ g/ml Doxyzyklin (+ Dox) kultiviert.

In den Parentalzellen TS/A und CT26HA hatte die Anwesenheit von Östrogen oder Doxycyclin keinen Einfluß auf das Koloniewachstum. Beide Tumorzelllinien zeigten die Fähigkeit, in Weichagar Kolonien zu bilden. Die Aktivierung von IRF-1 führte in TS/AIH Zellen zur Reduktion der Klone um 75%. Außerdem war auch die Größe der Kolonien stark reduziert (Abb. 2.6A). Die Zahl der CT26HA-IRF1 Kolonien verminderte sich durch Expression von IRF-1 um 80% (Abb. 2.6B). Es konnte somit gezeigt werden, dass IRF-1 den onkogenen Phänotyp von beiden Tumorzelllinien bezüglich der Weichagarkoloniebildung revertieren kann.

2.2.3 IRF-1 vermittelte Induktion der IFN- β -Expression

IRF-1 ist ein transkriptioneller Aktivator, der seine Wirkung über die Induktion von Zielgenen ausübt. Die ektopische Expression von IRF-1 führt zur Induktion von IFN- β (Kirchhoff et al. 1999). IRF-1 kann selbst an die PRD-Sequenz des IFN- β Promotors binden, um die Transkription des Gens zu induzieren. Zusätzlich stimuliert es über die Induktion der Proteinkinase PKR, welche über indirekte Phosphorylierung von I κ B zur Aktivierung von NF κ B führt, die IFN- β Transkription (Kirchhoff et al. 1999). IFN- β hat neben seiner antitumoralen Wirkung proinflammatorische, proliferationsinhibierende und immunstimulierende Eigenschaften. Es sollte untersucht werden, ob die Aktivierung bzw. Induktion von IRF-1 in den beiden Tumorzelllinien zur Sekretion von IFN- β führt. Dazu wurde IRF-1 in TS/AIH und CT26HA-IRF1 Zellen für 48 Stunden induziert bzw. aktiviert und anschließend das sekretierte IFN im Überstand mit Hilfe eines antiviralen Tests bestimmt.

Tab. 2.1 IRF-1 induziert die Sekretion von IFN- β in TS/A und CT26HA Zellen

	IFN- β (Einheiten/ml)			IFN- β (Einheiten/ml)	
	– E2	+ E2		– Dox	+ Dox
TS/A	n.d.	n.d.	CT26HA	n.d.	n.d.
TSAIH	n.d.	500	CT26HA-IRF1	n.d.	1000

n.d.: nicht detektierbar (< 62 Einheiten/ml)

In den Überständen der Parentalzellen konnte kein IFN- β nachgewiesen werden. Die Aktivierung von IRF-1 in TS/AIH Zellen führte zur Sekretion von 500 Einheiten IFN- β pro ml Medium. Nach IRF-1 Expression in CT26HA-IRF1 Zellen wurden 1000 Einheiten IFN- β pro ml im Medium nachgewiesen (Tab. 2.1). Dieser Test zeigt, dass die Aktivierung oder Induktion von IRF-1 in den Tumorzellen zur Induktion und Sekretion von IFN- β führt.

2.2.4 Erhöhung der MHC Klasse I Expression

MHC Moleküle sind membrangebundene Glykoproteine, die auf der Zelloberfläche Peptide präsentieren. MHC Klasse I Moleküle werden von nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Zytotoxische T-Zellen erkennen Peptid/MHC-Klasse-I-Komplexe und töten diese Zellen ab, wenn Fremdontogene präsentiert und erkannt werden. Dies ist in der Regel der Fall, wenn es sich um entartete Tumorzellen oder Virus-infizierte Zellen handelt. Die Expression von IFN- β oder IRF-1 führt zu einer Steigerung der MHC Klasse I Expression (Chang et al. 1992) und somit zu einer gesteigerten Präsentation von Molekülen auf der Zelloberfläche. IRF-1 induziert die für die Prozessierung und den Transport von MHC I Peptiden benötigten Proteine LMP-2 (Low Molecular Weight Protein-2) und TAP-1 (Transporter associated with Antigen Processing-1) (White et al. 1996). Es sollte untersucht werden, ob die Aktivierung oder Induktion von IRF-1 zu einer Veränderung der MHC Klasse I Expression in den beiden Zelllinien führt. Zur Bestimmung der MHC I Expression (H2D^d und H2K^d) auf der Oberfläche wurden die Tumorzellen für 48h mit β -Östradiol, IFN- β , Doxyzyklin oder ohne Stimulation inkubiert und die MHC Klasse I Moleküle auf der Zelloberfläche im FACS analysiert. Die Stimulation der Zellen mit IFN- β führte zu einer gesteigerten Expression der MHC Klasse I Moleküle auf der Zelloberfläche im Vergleich zur Basalexpression. Die Aktivierung von IRF-1 in den TS/AIH Zellen durch Östrogenstimulation führte zu einer ähnlich starken MHC Klasse I Expression wie durch IFN β -Stimulation (Abb. 2.7A). Die gleichen Ergebnisse konnten in den CT26HA-IRF-1 Zellen beobachtet werden. Die Expression von IRF-1 durch Doxyzyklin Stimulation in den CT26HA-IRF1 Zellen führte in gleichem Ausmaß zu einer Erhöhung der MHC I Expression wie die IFN- β Behandlung. (Abb. 2.7B). Es konnte somit gezeigt werden, dass IRF-1 die Expression von MHC Klasse I Molekülen auf der Zelloberfläche beider Tumorzelllinien erhöht.

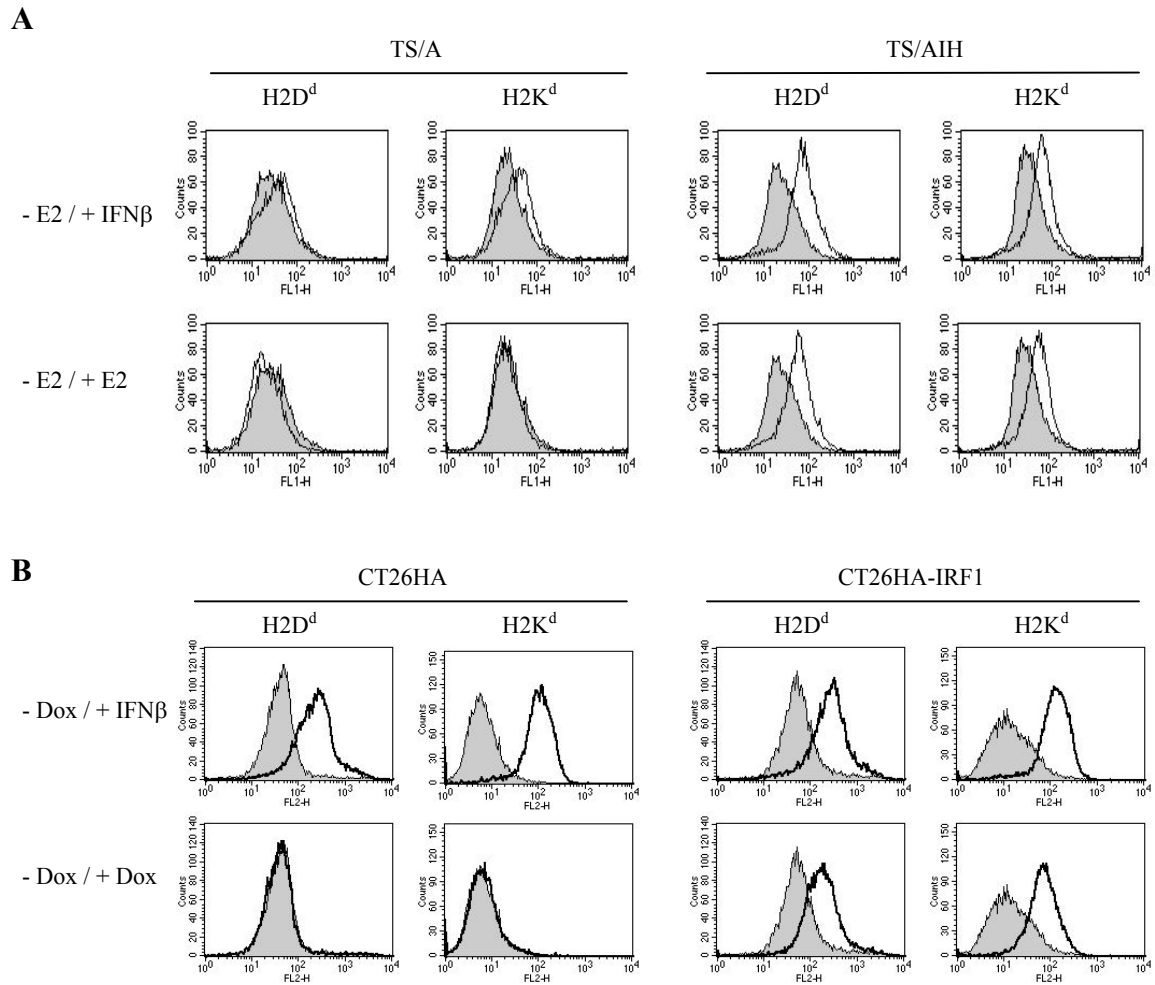


Abb. 2.7 Einfluß von IRF-1 auf die MHC Klasse I Expression

IRF-1 exprimierende Zellen und deren Parentalzellen wurden ausgesät. IRF-1 wurde für 48h aktiviert bzw. induziert. Die Zellen wurden mit anti-MHC I Antikörpern (H2D^d und H2K^d) angefärbt und im FACS analysiert (grau: unbehandelte Zellen, schwarz: stimulierte Zellen). A: TS/A Zellen und TS/AIH Zellen wurden 48h ohne (- E2) oder mit 1 μ M Östrogen (+ E2) oder 500 Einheiten /ml IFN β (+ IFN β) kultiviert. B: CT26HA Zellen und CT26HA-IRF1 Zellen wurden 48h ohne (- Dox) oder mit 2 μ g/ml Doxozyklin (+ Dox) oder 500 Einheiten /ml IFN β (+ IFN β) kultiviert.

2.2.5 Verbesserte Eliminierung von Tumorzellen durch zytotoxische T-Zellen

Wie im vorherigen Kapitel gezeigt erhöht IRF-1 die Expression der MHC Klasse I Moleküle auf der Zelloberfläche (Abb. 2.7). Durch die vermehrte Anzahl der MHC Klasse I Moleküle kann eine verbesserte Präsentation von Tumorantigenen erwartet werden und somit auch eine verbesserte Erkennung der Zellen durch spezifische zytotoxische T-Zellen.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die CT26HA-IRF1 Zellen als Zielzellen in einem Zytotoxizitätsassay eingesetzt (Abb. 2.8A). Als zytotoxische Effektorzellen wurden Milzzellen aus CL4 Mäusen (Morgan et al. 1996) in verschiedenen Konzentrationen verwendet, um die Lyse bei unterschiedlichen Verhältnissen von Effektorzelle zu Zielzelle zu untersuchen („E/T Ratio“). Ein Großteil der CD8+ Milzzellen aus diesen CL4 Mäusen exprimiert einen transgenen T-Zellrezeptor, der spezifisch für ein Klasse I HA-Peptid ist. Erkennen diese HA-spezifischen zytotoxischen T-Zellen das MHC Klasse I präsentierte HA-Peptid auf den CT26HA-IRF1 Zellen, werden die Tumorzellen lysiert. Die spezifische Lyse der Tumorzellen wurde in einem Chrom-Freisetzungstest bestimmt (Abb. 2.8B). Die Expression von IRF-1 in den CT26HA-IRF1 Zellen steigerte die Lyse durch zytotoxische T-Zellen um 11% im Vergleich zu Zellen, die kein IRF-1 exprimieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Expression von IRF-1 in CT26HA-IRF1 Tumorzellen zu einer verbesserten Erkennung durch HA-spezifische CD8+ Zellen führt.

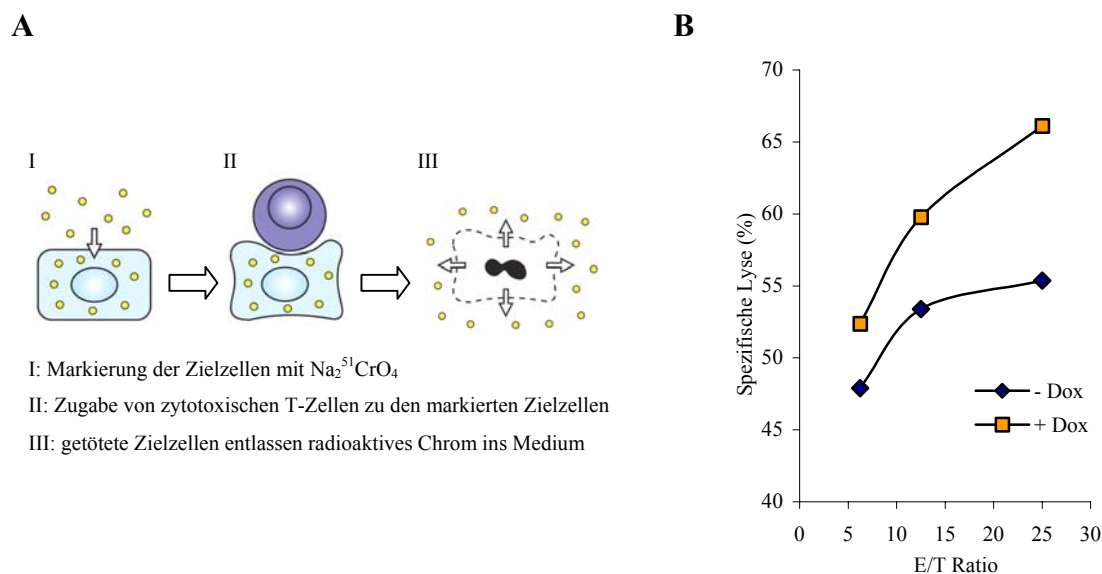


Abb. 2.8 Einfluß von IRF-1 auf die Eliminierung von Tumorzellen durch spezifische zytotoxische T-Zellen

A: Schematische Darstellung des Chrom-Freisetzungstests. I. Die Zielzellen werden radioaktiv markiert und zusammen mit zytotoxischen T-Zellen inkubiert. II. Die spezifische Bindung des T-Zellrezeptors an MHC Klasse I präsentierte HA-Peptide führt III. zur Lyse der Zielzellen, die radioaktives Chrom ins Medium abgeben. B: CT26HA-IRF1 Zellen wurden mit oder ohne Doxyzyklin (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) für 48h inkubiert und als Zielzellen in einem Chrom-Freisetzungstest eingesetzt. Milzzellen aus TCR/HA transgenen cl4 Mäusen wurden als Effektorzellen eingesetzt und die Lyse der ^{51}Cr -radioaktiv markierten Zielzellen nach 4h Inkubation gemessen.

2.2.6 Induktion von Chemokinen

Chemokine sind eine Subklasse der Zytokine, welche die Migration von Leukozyten entlang eines chemischen Ligandgradienten vermitteln, Einfluß auf die Entwicklung, Reifung und Degranulierung von Lymphozyten ausüben, sowie in der Angiogenese eine wichtige Rolle spielen (Belperio et al. 2000; Moser and Loetscher 2001). Eine mögliche Auswirkung der Induktion verschiedener Chemokine in den Tumorzellen kann eine verbesserte Anlockung und Infiltration von Lymphozyten in den Tumor sein und somit zur Stimulation einer tumorspezifischen Immunantwort führen. Für einige Chemokine wurde die Induktion durch Mitglieder der IRF Familie bereits beschrieben. Um eine mögliche IRF-1 vermittelte Induktion von Chemokinen zu untersuchen, wurden TS/AIH Zellen und TS/A wt Zellen für unterschiedliche Zeitspannen mit Östradiol behandelt, die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels quantitativer PCR wurde die Expression der Chemokine CCL2, CCL5, CCL7, CCL19, CXCL5 und CXCL10 untersucht.

CCL2, CCL5 und CCL7 gehören zur Gruppe der inflammatorischen Chemokine, die T-Zellen, Makrophagen, Leukozyten oder Dendritische Zellen zum Herd einer Endzündung oder eines Tumors rekrutieren. In den TS/A wt Zellen konnte keine Induktion der mRNA beobachtet werden, d.h. die Stimulation mit Östrogen hatte keinen Einfluß auf die Chemokininduktion (Abb.2.9). Die Aktivierung von IRF-1 in TS/AIH Zellen führte zu einer Erhöhung der mRNA Level von CCL2 (9-fach), CCL5 (7-fach) und CCL7 (5-fach). CCL19 ist ein homeostatisches Chemokin, das beim „Homing“ von Lymphozyten in die Lymphknoten und andere sekundäre lymphoide Organe eine Rolle spielt. Nach Aktivierung von IRF-1 in den TS/AIH Zellen wurde die CCL19 mRNA 8-fach induziert (Abb. 2.9). Die CXC-Chemokine CXCL5 und CXCL10 zeigen neben chemotaktischen Effekten auch einen Einfluß auf die Angiogenese. Während CXCL5 Angiogenese-unterstützend wirkt, hemmt CXCL10 die Angiogenese. Durch Aktivierung von IRF-1 in den TS/AIH Zellen wurde das angiostatische Chemokin CXCL10 52-fach induziert, während CXCL5 nicht beeinflusst wurde (Abb. 2.9). Durch Analyse der mRNA Level in TS/AIH Zellen konnte gezeigt werden, dass IRF-1 verschiedene Chemokine induziert.

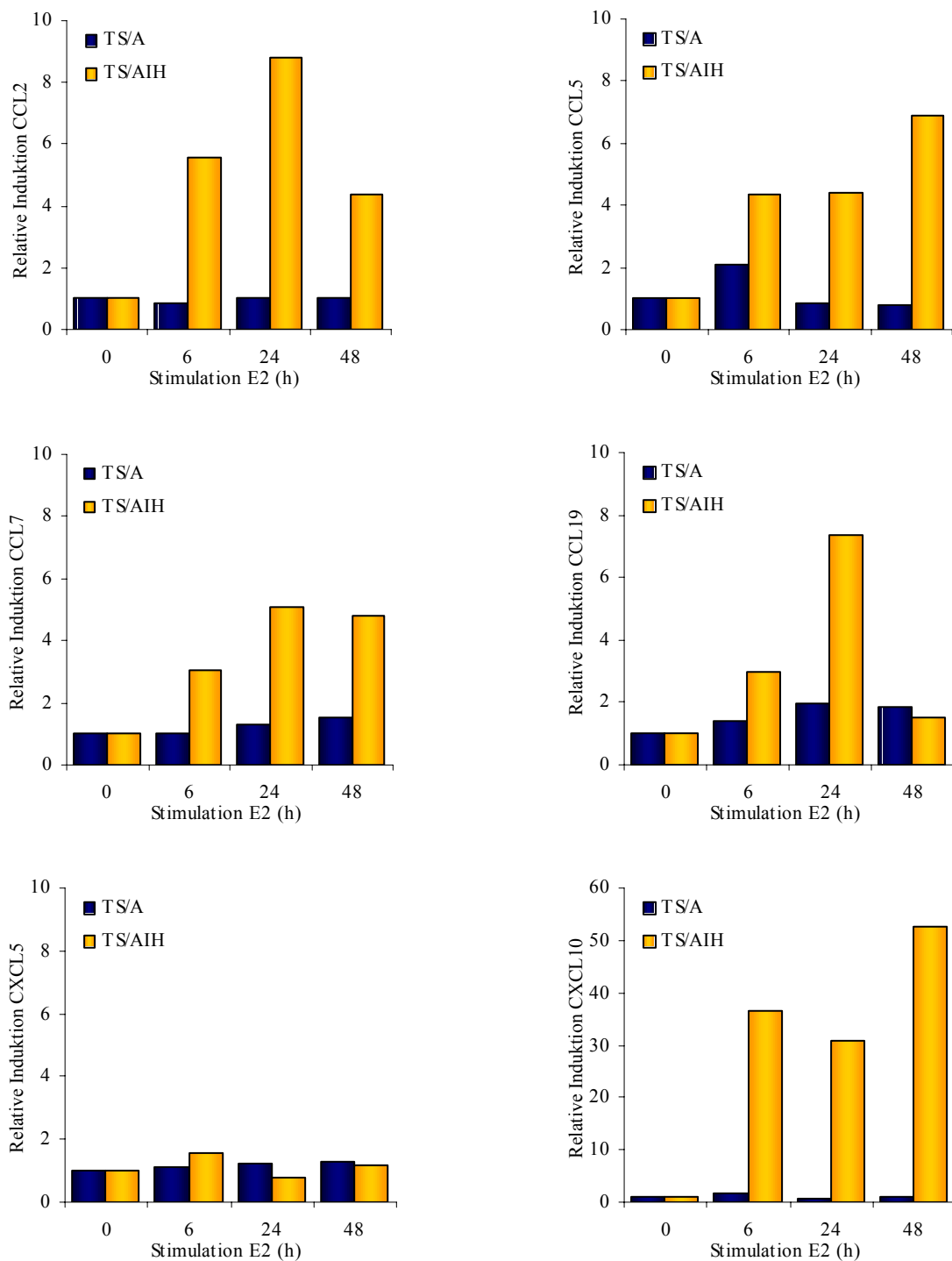


Abb. 2.9 Einfluß von IRF-1 auf die Expression von Chemokinen

IRF-1 exprimierende TS/AIH Zellen und deren Parentalzellen wurden für 0h, 6h, 24h und 48h mit Östradiol (1µM) inkubiert, die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Geninduktion der Chemokine CCL2, CCL5, CCL7, CCL19, CXCL5 und CXCL10 wurde im Light Cycler mittels quantitativer PCR nachgewiesen. Der mRNA-Level der Chemokine ohne Stimulation (0h) wurde gleich 1 gesetzt.

2.2.7 Verbesserte Anlockung von Lymphozyten

Die Expression von IRF-1 führt zur Induktion einiger Chemokine (Abb. 2.9). Chemokine sind an der Anlockung von Lymphozyten beteiligt (Moser and Loetscher 2001). Es sollte untersucht werden, ob die Induktion von Chemokinen durch IRF-1 zu einer veränderten Migration von Lymphozyten führt. Dazu wurde ein „Transwell Assay“ durchgeführt. CT26HA-IRF1 Zellen wurden für 48 Stunden ausplattiert und entweder unbehandelt gelassen oder für die letzten 6 oder 24 Stunden mit Doxyzyklin behandelt, um die IRF-1 Expression zu induzieren (Abb. 2.10A). In die obere Kammer wurden 1×10^6 frisch isolierte Milzzellen plattiert, der Test für 3h inkubiert und anschließend die in die untere Kammer eingewanderten Milzzellen gezählt.

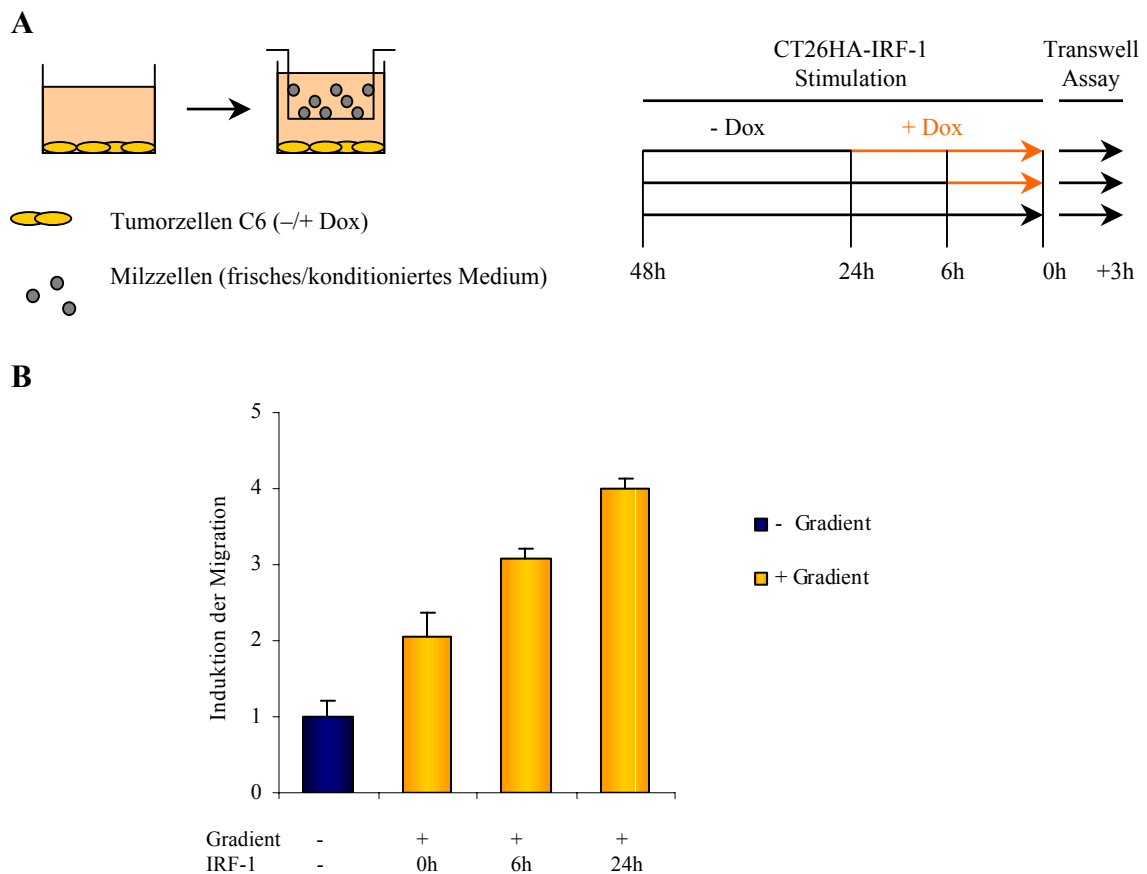


Abb. 2.10 Einfluß von IRF-1 auf die Migration von Lymphozyten

A: Schematische Darstellung der CT26HA-IRF1 Stimulation und des „Transwell Assays“. CT26HA-IRF1 Zellen wurden auf 24well Platten ausplattiert und für 48h inkubiert. Die letzten 0h, 6h oder 24h wurden die Zellen mit Doxyzyklin (2 $\mu\text{g/ml}$) behandelt. In die obere Kammer wurden 1×10^6 frisch isolierte Balb/c Milzzellen in frischem (+ Gradient) oder konditioniertem (- Gradient, von CT26HA-IRF1 6h+Dox) Medium plattiert und der „Transwell Assay“ für 3h inkubiert. B: Die durch die Membran migrierten Lymphozyten in der unteren Kammer wurden gezählt und die Migrationsrate berechnet. Die Migration der Milzzellen ohne chemischen Gradienten (Medium von CT26HA-IRF1 6h+Dox in der oberen und unteren Kammer) wurde gleich 1 gesetzt.

Um die basale Migrationsrate der Lymphozyten zu bestimmen, wurden diese in der oberen Kammer im gleichen Medium inkubiert wie die Tumorzellen in der unteren Kammer, so dass kein Gradient löslicher Faktoren zwischen den beiden Kammern vorhanden war. In drei Stunden wanderten $3,5 \times 10^4$ Lymphozyten durch die Membran, dieser Wert wurde gleich eins gesetzt (Abb. 2.4B). Während der 48-stündigen Inkubation der Tumorzellen sezernierten diese vermutlich Faktoren ins Medium, die die Migrationsrate der Lymphozyten verdoppelten. Eine 6-stündige Expression von IRF-1 durch Doxyzyklingabe erhöhte die Migration auf den 3,1-fachen Wert, eine 24-stündige Expression von IRF-1 führte zu einer 4-fachen Induktion der Migration.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression von IRF-1 zur einer erhöhten Attraktion von Lymphozyten führt, die durch lösliche Faktoren vermittelt wird. Hierbei könnten Chemokine eine Rolle spielen.

2.3 Einfluß von IRF-1 auf das Wachstum von Tumoren in vivo

Die Expression von IRF-1 in Tumorzellen führt zur Inhibition der Proliferation (Kap. 2.2.1) und zu einer Reversion des onkogenen Phänotyps (Kap. 2.2.2). Es sollte untersucht werden, ob diese intrinsischen Effekte von IRF-1 ausreichen, um das Tumorstadium *in vivo* zu verhindern oder zu verlangsamen.

In den *in vitro* Experimenten konnte bereits gezeigt werden, daß IRF-1 die Expression von MHC I auf den Tumorzellen erhöht (Kap. 2.2.4) und die Tumorzellen besser durch zytotoxische T-Zellen erkannt und eliminiert werden (Kap. 2.2.5). Weiterhin wurde eine IRF-1 vermittelte Induktion von Chemokinen gemessen (Kap. 2.2.6) und eine verbesserte Anlockung von Lymphozyten gezeigt (Kap. 2.2.7). Es sollte deshalb untersucht werden, welchen Einfluß die Expression von IRF-1 in Tumorzellen auf das Tumorstadium in syngen immunkompetenten Mäusen hat. Für die folgenden Tumorstadiumsstudien wurden CT26HA-IRF1 Tumorzellen Mäusen subkutan injiziert und das Wachstum von Unterhauttumoren beobachtet.

2.3.1 Tumorstadium in Nacktmäusen

Nacktmäuse haben kein funktionelles adaptives Immunsystem, da ihnen die sich im Thymus entwickelnden T-Zellen fehlen. In diesen Mäusen können daher nur Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Natural Killer (NK) Zellen, zur Eliminierung von

Tumorzellen beitragen. Es sollte untersucht werden, welchen Einfluß das Fehlen von T-Helferzellen, vor allem aber auch von zytotoxischen T-Zellen auf das Tumorstadium *in vivo* ausübt.

Zur Erzeugung von Unterhauttumoren wurden 5×10^5 CT26HA-IRF-1 Zellen subkutan in die Flanke von Nacktmäusen injiziert. Das Wachstum der Tumore wurde dreimal pro Woche durch die Messung des Tumordurchmessers bestimmt. Der Wachstumsverlauf der Tumore ist in Abb. 2.11B dargestellt. Die Injektion von CT26HA-IRF-1 Zellen führte in unbehandelten Mäusen (-Dox) zu einem gleichmäßigen Tumorstadium. Nach 19 Tagen erreichten die Tumore einen mittleren Durchmesser von 10 mm und die Mäuse wurden gemäß Tierschutzantrag getötet. Die Induktion von IRF-1 in den Tumorzellen (+Dox) führte zu einer Verlangsamung des Tumorstadiums, konnte es aber nicht verhindern. Nach 19 Tagen erreichten die Tumore einen mittleren Durchmesser von 7,9 mm, ein Durchmesser von 10 mm wurde nach 24 Tagen erreicht.

Es konnte somit gezeigt werden, dass die intrinsischen Effekte von IRF-1, wie die Proliferationsinhibition und die Reversion des Phänotyps, in Nacktmäusen zwar zu einer Verzögerung des Tumorstadiums führen, das Tumorstadium aber nicht verhindern können.

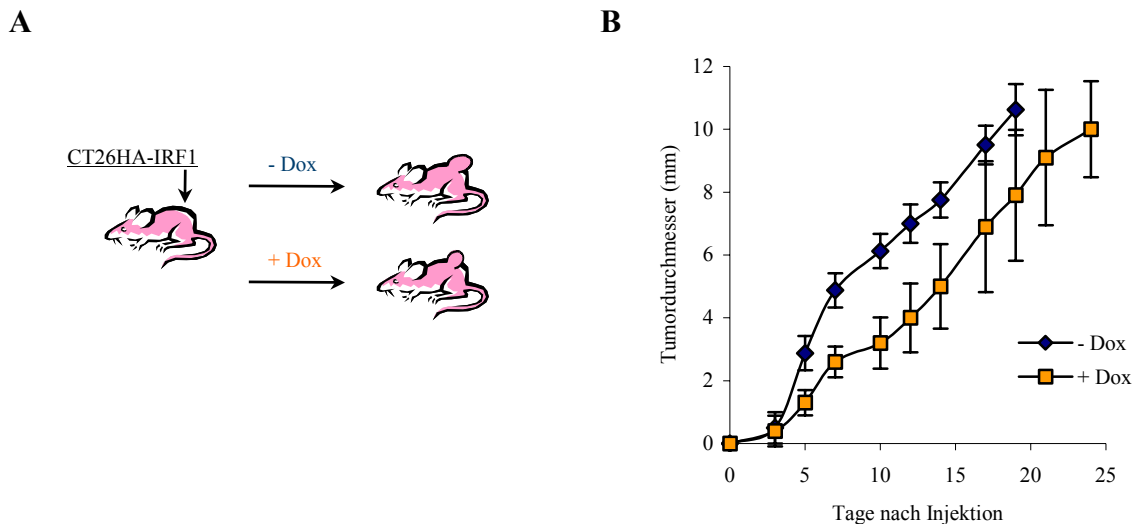


Abb. 2.11 Einfluß von IRF-1 auf das Tumorstadium in Nacktmäusen

10 NMRI Nacktmäusen wurden 5×10^5 CT26HA-IRF1 Zellen in 100 µl PBS subkutan in die rechte Flanke injiziert. 5 Mäuse wurden mit Doxyzyklin-haltigem Trinkwasser (200 µg/ml) behandelt, die anderen 5 Mäuse erhielten normales Trinkwasser. A: Schematische Darstellung des Nacktmaus-Experiments B: Der mittlere Durchmesser der wachsenden Tumore wurde gemessen und das Tumorstadium je Gruppe in Abhängigkeit der Versuchsdauer ermittelt.

2.3.2 Reduktion von Tumoren in syngen Mäusen

Die Expression von IRF-1 führt zu einer Reihe von Phänotypen, die zur Stimulierung des Immunsystems und zu einer verbesserten Erkennung der Zellen durch das Immunsystem führen können. Es sollte daher untersucht werden, welchen Einfluss die Expression von IRF-1 in Tumorzellen im syngen immunkompetenten Mausmodell hat. Dazu wurden 5×10^5 CT26HA-IRF1 Zellen subkutan in die Flanke von Balb/c Mäusen injiziert und der Tumordurchmesser dreimal pro Woche gemessen (Abb. 2.12). Alle Mäuse, in deren Tumorzellen kein IRF-1 exprimiert wurde (-Dox), entwickelten einen stetig wachsenden Tumor, der nach drei Wochen einen mittleren Durchmesser von 7 mm erreichte. Bei Mäusen, in denen IRF-1 in den Tumorzellen direkt nach der Injektion durch die Gabe von Doxyzyklin im Trinkwasser induziert wurde (+Dox), wurde bei 5 von 10 Mäusen nach 6 Tagen Tumore von 1 mm nachgewiesen, die anderen 5 blieben tumorfrei. Bei den 5 Mäusen mit kleinem Tumor war 15 Tage nach Injektion kein Tumor mehr nachweisbar, so dass alle Tiere, in denen IRF-1 durch Dox-Behandlung induziert wurde, tumorfrei waren. Dies zeigt, dass die Expression von IRF-1 in Tumorzellen das Wachstum von Tumoren in syngen Mäusen vollständig unterbinden oder kleine Tumore zurückbilden kann.

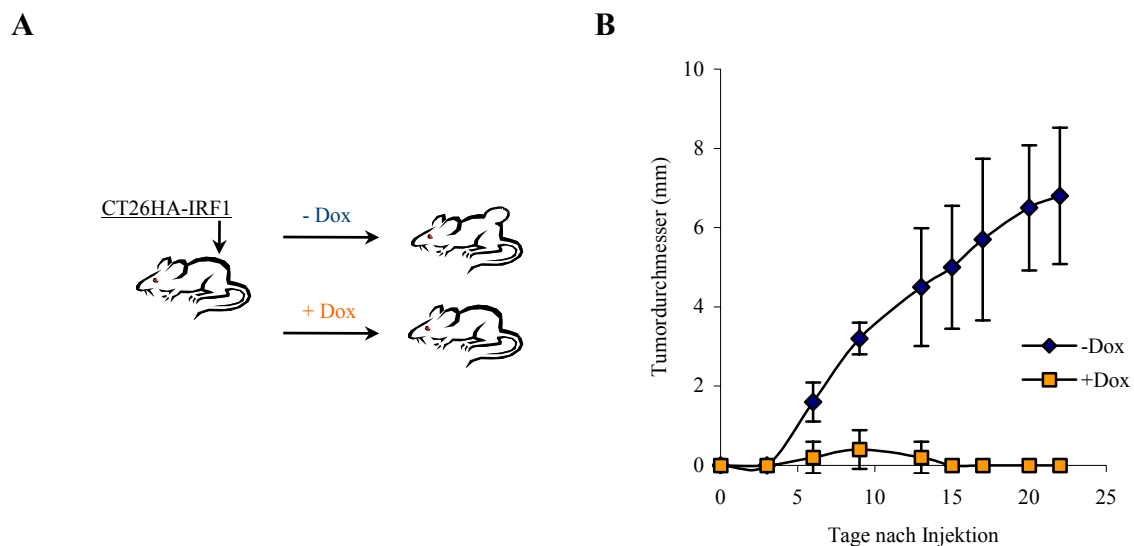


Abb. 2.12 Einfluß von IRF-1 auf das Tumorstwachstum in immunkompetenten Mäusen

10 Balb/c Mäusen wurden 5×10^5 CT26HA-IRF1 Zellen subkutan in die rechte Flanke injiziert. Je 5 Mäuse wurden mit Doxyzyklin-haltigem Trinkwasser (200 µg/ml) behandelt, die anderen 5 Mäuse erhielten normales Trinkwasser. A: Schematische Darstellung des Balb/c Maus-Experiments. B: Der mittlere Durchmesser der wachsenden Tumore wurde gemessen und das Tumorstwachstum je Gruppe in Abhängigkeit der Versuchsdauer ermittelt.

2.4 Charakterisierung einer tumorspezifischen T-Zell-vermittelten Immunantwort

Die Expression von IRF-1 in Tumorzellen führt zu einer Verlangsamung des Tumorstwachstums in Nacktmäusen (Abb. 2.11), im Gegensatz dazu wird die Ausbildung von Tumoren in syngen Mäusen vollständig verhindert (Abb. 2.12). Die Expression von IRF-1 in Tumorzellen führt zur Induktion immunstimulierender Gene. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass zur vollständigen Reduktion der Tumore *in vivo* ein funktionelles Immunsystem notwendig ist. Die Induktion einer tumorverwerfenden Immunantwort durch IRF-1 soll in diesem Kapitel genauer untersucht werden.

2.4.1 Erstellung des Lymphozytenprofils in Milz und drainierenden Lymphknoten

In immunkompetenten syngen Mäusen wird durch die Expression von IRF-1 in Tumorzellen das Tumorstwachstum unterdrückt oder kleine Tumore wieder vollständig zurückgebildet (Abb. 2.12). Vermutlich sind dafür Lymphozyten verantwortlich. Es sollte daher untersucht werden, ob die IRF-1 Expression im Tumor während des Wachstums bzw. der Regression Einfluß auf die verschiedenen Populationen von Lymphozyten ausübt. Hierzu wurden die Lymphozyten aus Milz und Tumor-drainierendem sowie kontralateralem Lymphknoten von vier Mausgruppen im FACS analysiert. Bei zehn Mäusen wurden CT26HA-IRF1 Unterhauttumore gesetzt und die Hälfte mit Doxzyklin-haltigem Wasser gefüttert (CT26HA-IRF1 +Dox), während die andere Hälfte unbehandelt blieb (CT26HA-IRF1 –Dox). Alle Dox-behandelten Mäuse, in deren Tumoren IRF-1 exprimiert wurde, waren zwei Wochen nach Zellinjektion tumorfrei, während in den unbehandelten Mäusen die Tumore ohne IRF-1 Expression stetig wuchsen (vgl. Kap. 2.3.2). Um den Einfluß von Doxzyklin auf die Lymphozytenpopulationen zu untersuchen, wurden zehn weiteren Mäusen keine Tumore gesetzt (naiv), fünf davon wurden mit Doxzyklin-haltigem Wasser gefüttert (naiv +Dox), die anderen blieben unbehandelt (naiv –Dox). Nach drei Wochen wurden alle Mäuse getötet und die Lymphozyten analysiert. Die Behandlung mit Doxzyklin zeigte keinen Einfluß auf die verschiedenen Populationen von Lymphozyten. Die Anzahl an T-Zellen (CD3+) in naiven Kontrollmäusen betrug ca. 32% der Lymphozyten in der Milz. In den tumortragenden Mäusen, deren Tumorzellen kein IRF-1 exprimierten, war die Anzahl der T-Zellen auf 16% halbiert. Im Gegensatz dazu zeigten Mäuse, in denen

IRF-1 in den Tumorzellen durch Doxyzyklin induziert wurde, ein normales Niveau an T-Zellen in der Milz von über 30% (Abb. 2.13, Reihe 1).

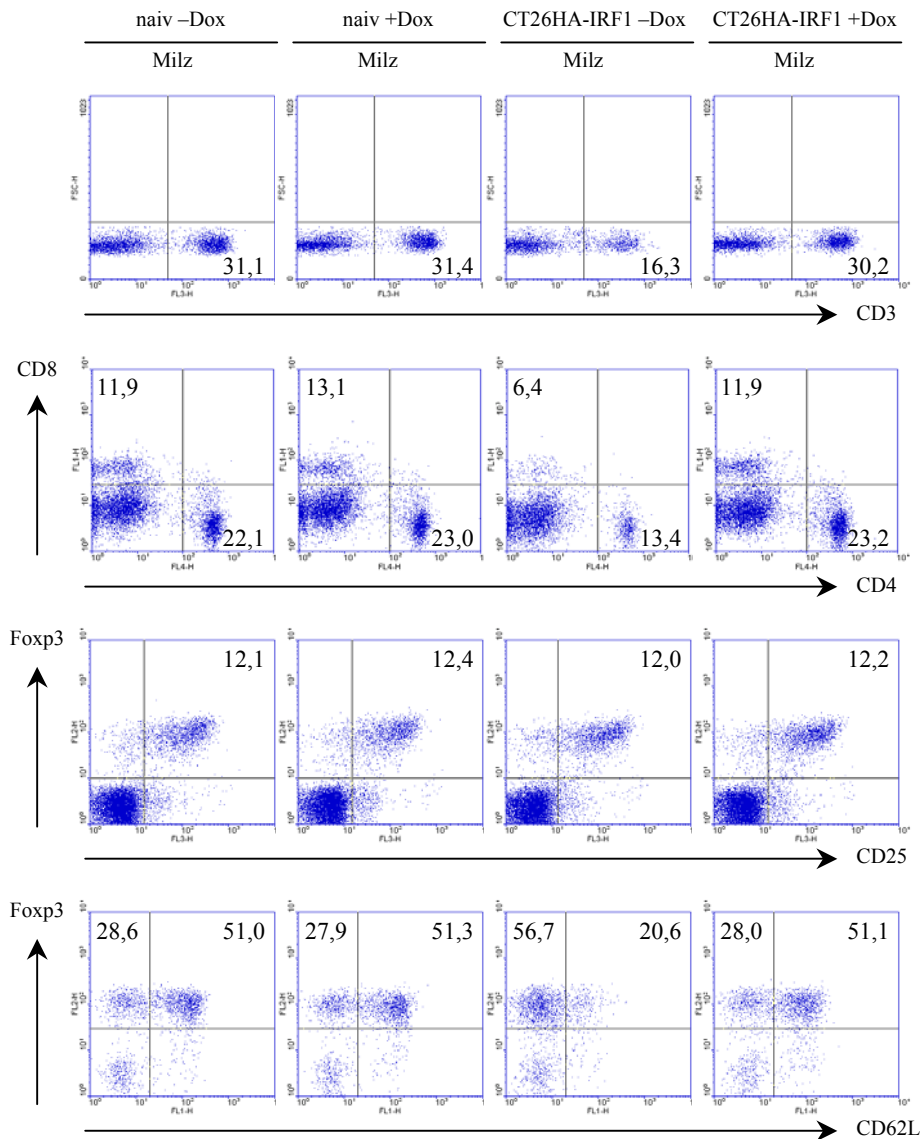


Abb. 2.13 Einfluß von IRF-1 auf T-Lymphozyten in der Milz

10 Balb/c Mäusen wurden 5×10^5 CT26HA-IRF1 Zellen subkutan in die rechte Flanke injiziert. Je 5 Mäuse wurden mit Doxyzyklin-haltigem Trinkwasser (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) behandelt, die anderen 5 Mäuse erhielten normales Trinkwasser. Weiteren 10 Balb/c Mäusen wurden keine Tumore gesetzt (naive Kontrollmäuse), 5 Mäuse wurden mit Doxyzyklin-haltigem Trinkwasser behandelt, die anderen erhielten normales Trinkwasser. 3 Wochen nach der Injektion wurden alle Mäuse getötet und die Milz sowie der Tumor-drainierende und der kontralaterale Lymphknoten isoliert. Die Lymphozyten wurden im FACS analysiert. Reihe 1: T-Zellen: CD3+/Lymphozyten, Reihe 2: Zytotoxische T-Zellen: CD8+/Lymphozyten, T-Helferzellen: CD4+/Lymphozyten, Reihe 3: Regulatorische T-Zellen: CD4+CD25+Foxp3+/CD4+, Reihe 4: aktive regulatorische T-Zellen: CD4+CD25+Foxp3+CD62L low/CD4+CD25+.

T-Zellen können in zwei Hauptgruppen unterteilt werden, T-Helferzellen (CD4+) und zytotoxische T-Zellen (CTLs, CD8+). T-Helferzellen unterstützen und aktivieren andere Immunzellen, während CTLs in der Lage sind, Zielzellen durch deren Expression von spezifischen Antigenen zu erkennen und zu eliminieren. Es sollte untersucht werden, ob die Expression von IRF-1 in Tumorzellen Einfluß auf die Subpopulationen der T-Zellen ausübt.

Der normale Prozentsatz der CD4+ T-Helferzellen betrug in den naiven Mäusen 22% der Lymphozyten in der Milz, die CD8+ CTLs machten einen Anteil von 12% aus (Abb. 2.13, Reihe 2). Doxyzyklin hatte keinen Einfluß auf die T-Zellpopulationen. In der Milz tumortragender Mäuse, in deren Tumoren kein IRF-1 exprimiert wurde, waren die T-Helferzellen auf 13% und die CTLs auf 6% reduziert, während in der Milz tumorfreier Mäuse, in deren Tumorzellen IRF-1 exprimiert worden war, ein normales Niveau von T-Helferzellen (23%) und CTLs (12%) gemessen wurde.

Abgesehen von den T-Effektorzellen, die eine T-Zell-Immunantwort vermitteln können, gibt es eine Population von T-Zellen mit regulatorischen Potential, die andere Immunzellen hemmen können. Diese regulatorischen T-Zellen (Tregs, CD4+CD25+Foxp3+) wurden ebenfalls analysiert. Der Anteil der Tregs der CD4+ T-Zellen in der Milz war in allen Mausgruppen gleich (Abb. 2.13, Reihe 3). Allerdings konnten Unterschiede bei der Expression des Oberflächenmarkers CD62L detektiert werden (Abb. 2.13, Reihe 4). CD62L spielt eine Rolle beim „Homing“ in die Lymphknoten und wird nach Aktivierung von T-Zellen herunterreguliert, so dass eine niedrige Expression (CD62L_{low}) als Aktivierungsmarker dient (Huehn and Hamann 2005; Venturi et al. 2007). Von den CD4+CD25+ T-Zellen der Milz in naiven Mäusen waren 28% Foxp3+CD62L_{low} und 51% Foxp3+CD62L_{high}, Doxyzyklin hatte keinen Einfluß auf diese Verteilung. In tumortragenden Mäusen, in deren Tumoren kein IRF-1 exprimiert wurde, waren 57% der CD4+CD25+ T-Zellen Foxp3+CD62L_{low} und 20% Foxp3+CD62L_{high}. In der Milz tumorfreier Mäuse dagegen, in deren Tumorzellen IRF-1 exprimiert worden war, zeigten die CD4+CD25+ T-Zellen ein normales Verhältnis von 28% Foxp3+CD62L_{low} und 51% Foxp3+CD62L_{high}.

Die Analyse der T-Zellen in der Milz hat gezeigt, daß in unbehandelten tumortragenden Mäusen die zytotoxischen T-Zellen und die T-Helferzellen reduziert sind, während vermehrt aktive regulatorische T-Zellen detektiert werden. Die Expression von IRF-1 in den Tumorzellen verhindert diesen Phänotyp, die T-Zellpopulationen zeigen ein normales

Niveau im Vergleich zu naiven Mäusen. Doxzyklin selbst hat keinen Einfluß auf die Lymphozytenanzahl.

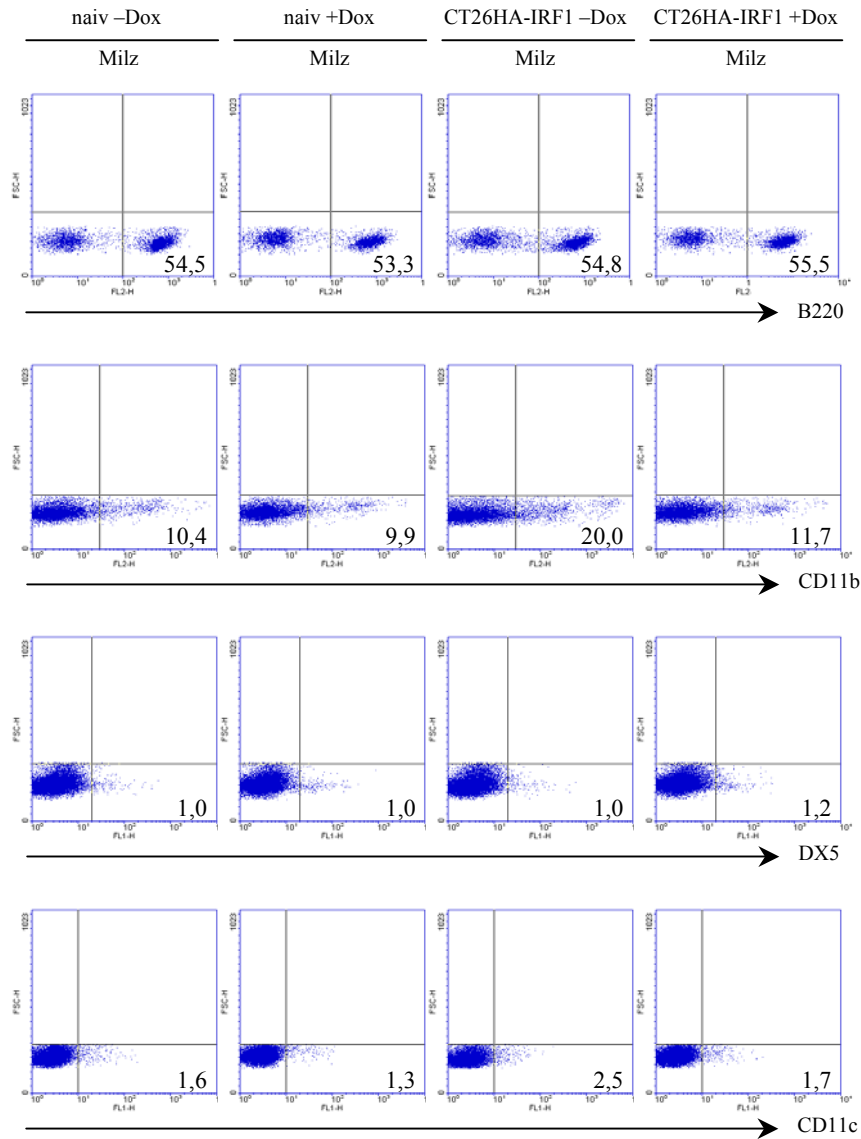


Abb. 2.14 Einfluß von IRF-1 auf Lymphozytenpopulationen in der Milz

10 Balb/c Mäusen wurden 5×10^5 CT26HA-IRF1 Zellen subkutan injiziert, 10 Mäusen wurden keine Tumore gesetzt. Die eine Hälfte wurde mit Doxzyklin-haltigem Trinkwasser (200 $\mu\text{g/ml}$) behandelt, die andere Hälfte der Mäuse erhielt normales Trinkwasser. Die Lymphozyten der Milz wurden isoliert und im FACS analysiert. Reihe 1: B-Zellen: B220+/Lymphozyten, Reihe 2: Makrophagen: CD11b+/Lymphozyten, Reihe 3: NK-Zellen: DX5+/Lymphozyten, Reihe 4: Dendritische Zellen: CD11c+/Lymphozyten.

Neben den T-Zellen wurden noch weitere Populationen von Lymphozyten analysiert. Die B-Zellanzahl (B220) lag in allen Mausgruppen bei 55% der Lymphozyten in der Milz (Abb. 2.14, Reihe 1), auch der Anteil an NK-Zellen (DX5) war gleich bei 1% (Abb. 2.14,

Reihe 3). Der Anteil der Makrophagen (CD11b) von den Lymphozyten in der Milz betrug etwa 10% in naiven Mäusen. In tumortragenden Mäusen dagegen, in deren Tumoren kein IRF-1 exprimiert wurde, lag der Wert bei 20%, während die tumorfreien Mäuse, in deren Tumorzellen IRF-1 exprimiert worden war, den normalen Wert von 10% zeigten. Der Anteil Dendritischer Zellen (CD11c) war in tumortragenden Mäusen, in deren Tumoren kein IRF-1 exprimiert wurde, um 1% erhöht (Abb. 2.14, Reihe 4) im Vergleich zu den anderen Mausgruppen.

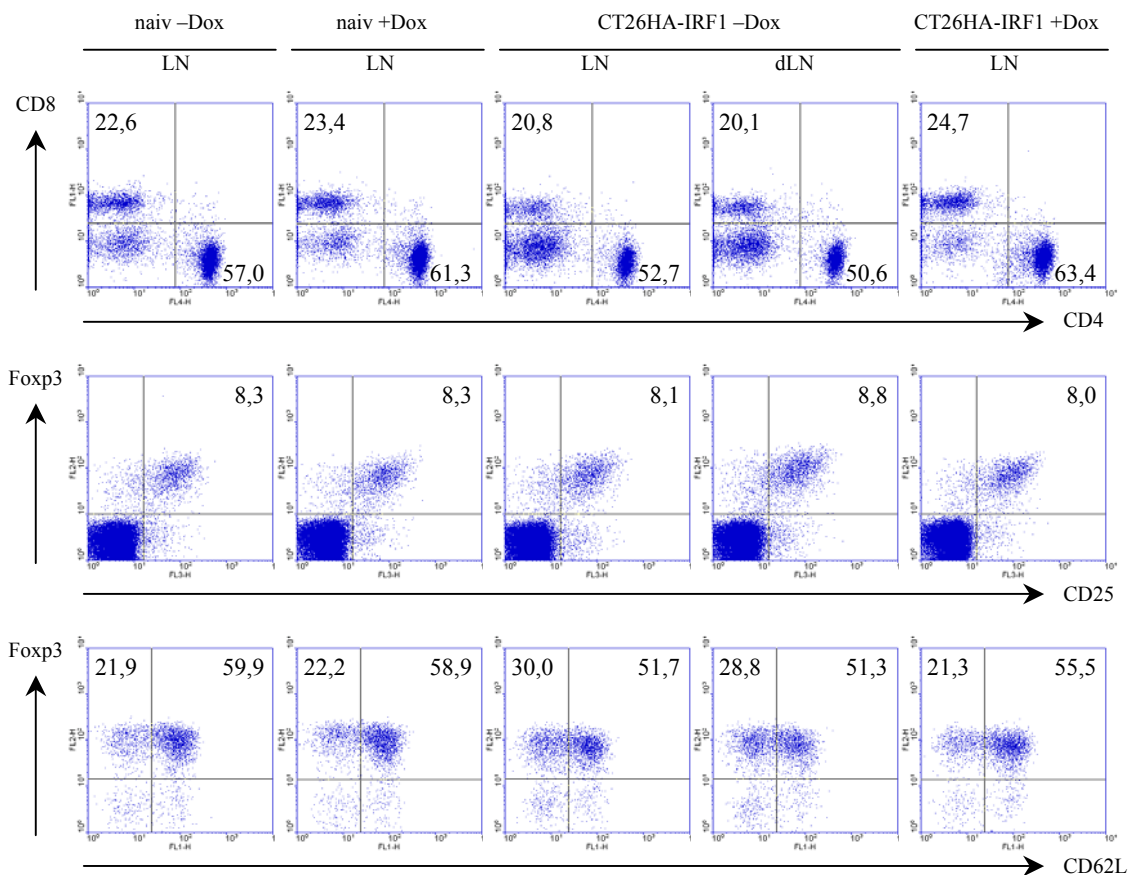


Abb. 2.15 Einfluß von IRF-1 auf T-Lymphozyten in drainierendem und kontralateralem Lymphknoten

10 Balb/c Mäusen wurden 5×10^5 CT26HA-IRF1 Zellen subkutan injiziert, 10 Mäusen wurden keine Tumore gesetzt. Die eine Hälfte wurde mit Doxzyklin-haltigem Trinkwasser (200 µg/ml) behandelt, die andere Hälfte der Mäuse erhielt normales Trinkwasser. Die Lymphozyten wurden isoliert und im FACS analysiert. Reihe 1: Zytotoxische T-Zellen: CD8+/Lymphozyten, T-Helfer-Zellen: CD4+/Lymphozyten, Reihe 2: Regulatorische T-Zellen: CD4+CD25+Foxp3+/CD4+, Reihe 3: aktive regulatorische T-Zellen: CD4+CD25+Foxp3+CD62L low/CD4+CD25+.

Die T-Zellen wurden auch im Tumor-drainierenden Lymphknoten (dLN) und einem Kontroll-Lymphknoten (LN) analysiert, da im drainierenden Lymphknoten naive T-Zellen zuerst auf Tumorantigen-präsentierende Zellen stoßen und eine tumorspezifische Immunantwort in die Wege geleitet wird. Die Ergebnisse waren mit den Analysen der Lymphozyten aus der Milz vergleichbar (Abb. 2.13), obwohl die Unterschiede z.T. nicht so deutlich waren.

Von den Lymphozyten im Lymphknoten naiver Mäuse waren 23% CD8⁺ und etwa 60% CD4⁺ T-Zellen, während in Mäusen mit Tumoren, die nicht IRF-1 exprimierten, 20% CD8⁺ und 50-52% CD4⁺ waren (Abb. 2.15, Reihe 1). Mäuse, die einen IRF-1 exprimierenden Tumor abgestoßen hatten, zeigten knapp 25% CD8⁺ und 63% CD4⁺ T-Zellen im Lymphknoten. Der Anteil der Tregs in den Lymphknoten war in den 4 Mausgruppen nahezu gleich (Abb. 2.15, Reihe 2). Die Analyse der CD62L Expression ergab, dass in naiven Mäusen 22% der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen Foxp3⁺CD62L_{low} und ca. 60% Foxp3⁺CD62L_{high} waren und dass Dox keinen Einfluß hatte (Abb. 2.15, Reihe 3). In tumortragenden Mäusen, in deren Tumoren kein IRF-1 exprimiert wurde, waren knapp 30% der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen Foxp3⁺CD62L_{low} und 51% Foxp3⁺CD62L_{high}. In tumorfreien Mäusen dagegen, in deren Tumorzellen IRF-1 exprimiert worden war, zeigten von den CD4⁺CD25⁺ T-Zellen 21% eine Expression von Foxp3⁺CD62L_{low} und 55% eine Expression von Foxp3⁺CD62L_{high}.

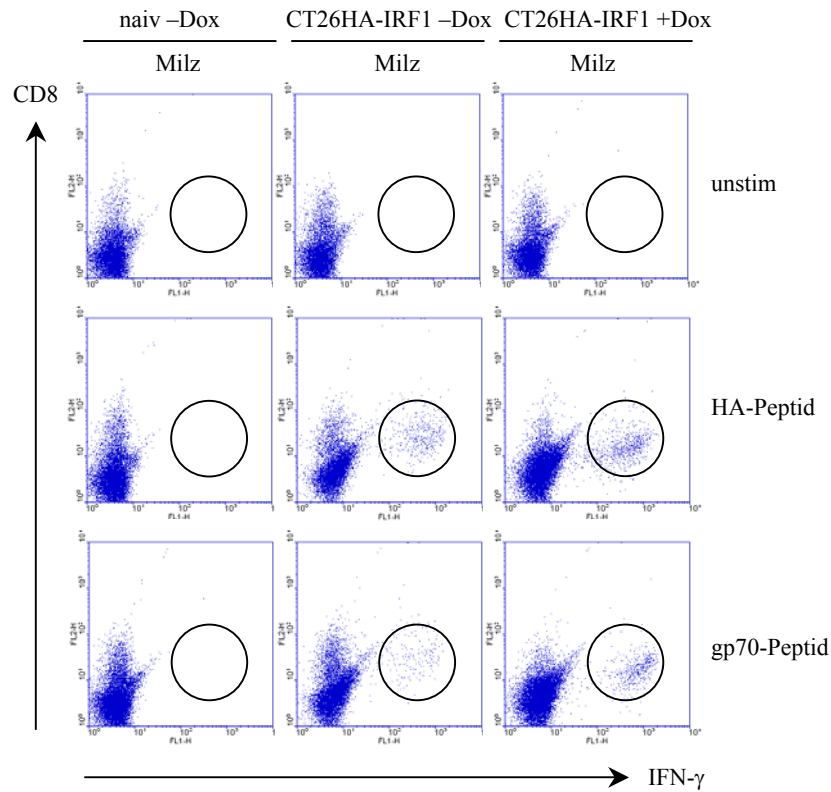
Die Analyse der Lymphozyten hat gezeigt, dass in den Mäusen mit Tumoren ohne IRF-1 Expression die Zellzahl der analysierten Subpopulationen von Lymphozyten sowohl in der Milz als auch in den Lymphknoten verändert ist. Die Expression von IRF-1 in den Tumorzellen wirkt diesem Phänotyp entgegen. In Mäusen, in denen durch Doxyzyklin-Behandlung IRF-1 in den Tumorzellen exprimiert wird, zeigen die Lymphozyten eine normale Verteilung.

2.4.2 Induktion der IFN γ -Synthese in aktivierten zytotoxischen T-Zellen

Bei der Eliminierung von Tumoren durch das Immunsystem spielen tumorspezifische zytotoxische T-Zellen eine wichtige Rolle. Die CTLs können mittels ihres T-Zellrezeptors spezifische MHC Klasse I präsentierte Tumorantigene erkennen und in diesen Zielzellen Apoptose auslösen. Werden CTLs durch Erkennung ihres spezifischen Antigens stimuliert, proliferieren diese aktivierten T-Zellen und synthetisieren eine Reihe von Zytokinen, wie

z.B. IFN- γ . Die Produktion von IFN- γ nach spezifischer Stimulation kann im FACS durch Messung von intrazellulärem IFN- γ zur Analyse einer tumorspezifischen Immunantwort untersucht werden.

A



B

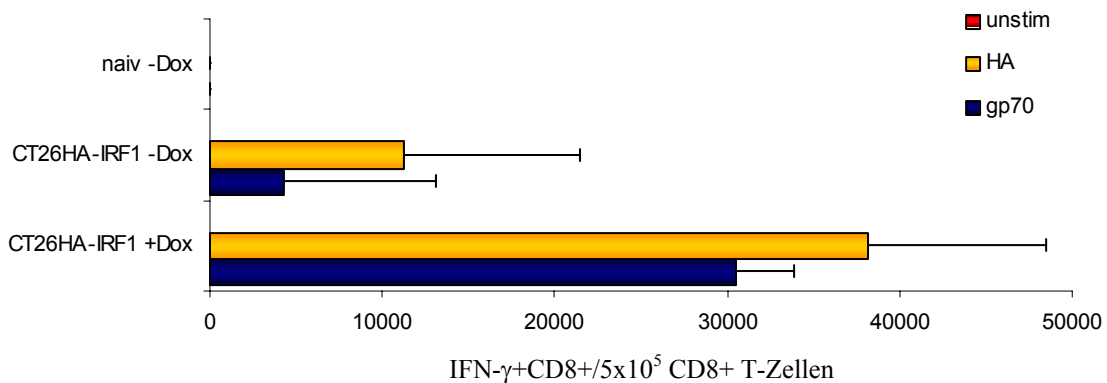


Abb. 2.16 IFN- γ Expression in CTLs nach Peptid-Stimulation

10 Balb/c Mäusen wurden 5×10^5 CT26HA-IRF1 Zellen subkutan injiziert, die eine Hälfte wurde mit Doxycyclin-haltigem Trinkwasser (200 $\mu\text{g/ml}$) behandelt, die andere Hälfte der Mäuse erhielt normales Trinkwasser. 5 Kontroll-Mäusen wurden keine Tumore gesetzt. Die Lymphozyten der Milz wurden nach 3 Wochen isoliert und 6 Tage *in vitro* mit HA-Peptid oder gp70-Peptid restimuliert. Nach 4h Inkubation mit Peptid und Brefeldin A wurden IFN- γ + CD8+ T-Zellen im FACS untersucht. A: FACS-Profil. B: Schematische Darstellung: IFN- γ +CD8+/ 5×10^5 CD8+ T-Zellen.

Es sollte analysiert werden, ob sich in Mäusen mit CT26HA-IRF1 Tumoren eine CTL-Antwort gegen spezifische Tumorantigene entwickelt und ob die Expression von IRF-1 in den Tumoren einen Einfluß auf die Entwicklung von spezifischen zytotoxischen T-Zellen hat. Lymphozyten aus der Milz naiver Kontrollmäuse (naiv –Dox), aus Mäusen mit wachsendem Tumor ohne IRF-1 Expression (CT26HA-IRF1 –Dox) und aus Mäusen, die einen IRF-1 exprimierenden Tumor abgestoßen haben (CT26HA-IRF1 +Dox), wurden für 6 Tage *in vitro* mit tumorspezifischem Peptid restimuliert und die IFN- γ Synthese nach Stimulation durch intrazelluläres FACS-Staining nachgewiesen (Abb. 2.16A). Zur Stimulation wurde ein Klasse I Peptid des Tumormodellantigens HA sowie ein Klasse I Peptid des endogenen Tumorantigens gp70 verwendet. In den naiven Mäusen konnten keine Tumorantigen-spezifischen CTLs nachgewiesen werden. Es wurden $1,1 \times 10^4$ HA-spezifische und $0,4 \times 10^4$ gp70-spezifische CTLs pro 5×10^5 zytotoxischer T-Zellen in Mäusen mit Tumoren ohne IRF-1 Expression detektiert (Abb. 2.16B). In Mäusen, in deren Tumorzellen IRF-1 durch Dox-Stimulation exprimiert und der Tumor abgestoßen wurde, liegt die Anzahl Tumorantigen-spezifischer, IFN- γ -produzierender CTLs 3,5- bis 7-fach höher. Hier wurden $3,8 \times 10^4$ HA-spezifische und 3×10^4 gp70-spezifische CTLs pro 5×10^5 zytotoxischer T-Zellen gemessen.

Die FACS-Analyse hat gezeigt, dass die Expression von IRF-1 in Tumoren zu einer erhöhten Anzahl Tumorantigen-spezifischer, IFN- γ -produzierender zytotoxischer T-Zellen führt, die sowohl auf das endogene Tumorantigen gp70 als auch das Modelltumorantigen HA reagieren.

2.4.3 Lyse von Tumorzellen durch spezifische zytotoxische T-Zellen

Die wichtigste Eigenschaft zytotoxischer T-Zellen ist die Fähigkeit, das Apoptoseprogramm in Zielzellen auszulösen und diese Zellen zu eliminieren. Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass die Expression von IRF-1 in Tumorzellen zur Entwicklung von Tumorantigen-spezifischen CTLs führt. Nun sollte untersucht werden, ob diese zytotoxischen T-Zellen in der Lage sind, Tumorzellen spezifisch zu erkennen und abzutöten. Dazu wurde ein Zytotoxizitätsassay durchgeführt (vgl. Abb. 2.8), in dem Milzzellen aus den verschiedenen Mausgruppen (naiv –Dox, CT26HA –Dox, CT26HA-IRF1 +Dox) als zytotoxische Effektorzellen (CTLs) und Tumorzellen als Zielzellen (CT26HA-IRF1, CT26wt, P815HA) in verschiedenen Verhältnissen („E/T Ratio“) eingesetzt wurden.

CTLs aus naiven Kontrollmäusen zeigten keine spezifische Lyse der verschiedenen Zielzellen. CTLs aus Mäusen mit Tumoren ohne IRF-1 (CT26HA -Dox) zeigten eine geringe Lyse der CT26HA Zellen von bis zu 20%. CTLs aus Mäusen, die einen IRF-1 exprimierenden Tumor abgestoßen hatten (CT26HA-IRF1 +Dox), lysierten bis zu 60% der Zellen (Abb. 2.17A).

Die CT26 wt Tumorzellen, die zwar kein HA aber gp70 Tumorantigen exprimieren, wurden durch CTLs aus Mäusen mit Tumoren ohne IRF-1 zu 40% lysiert, von CTLs aus Mäusen, die einen IRF-1 exprimierenden Tumor abgestoßen hatten, zu 90% (Abb. 2.17B).

Tumorzellen der Mastrozytoma Zelllinie P815, die das HA Antigen exprimieren, wurden durch CTLs aus Mäusen mit Tumoren ohne IRF-1 zu 40% lysiert, von CTLs aus Mäusen, die einen IRF-1 exprimierenden Tumor abgestoßen hatten, zu über 90% (Abb. 2.17C).

Dies zeigt, dass die Expression von IRF-1 in Tumoren zu einer erhöhten Aktivität zytotoxischer T-Zellen führt, die Tumorzellen erkennen und abtöten können. Hierbei werden sowohl wt Tumorzellen ohne HA-Antigen erkannt, die nur das endogene gp70 Antigen exprimieren, als auch Tumorzellen einer anderen Linie, die das HA-Modeltumorantigen exprimieren.

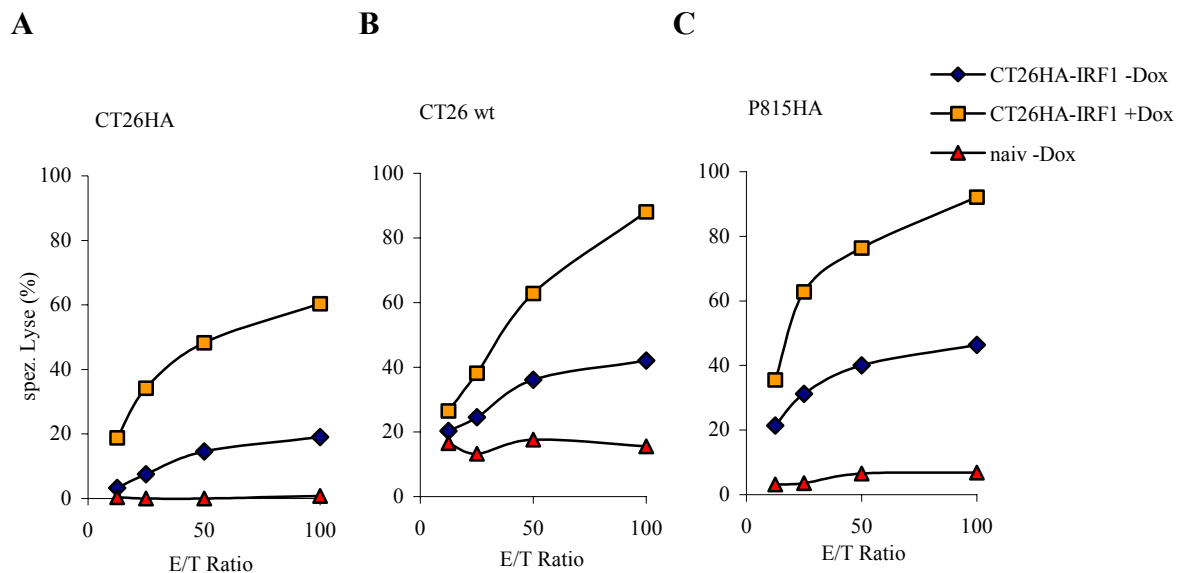


Abb. 2.17 Spezifische Lyse von Tumorzellen durch CTLs

10 Balb/c Mäusen wurden 5×10^5 CT26HA-IRF1 Zellen subkutan injiziert, die eine Hälfte wurde mit Doxzyklin-haltigem Trinkwasser (200 µg/ml) behandelt, die andere Hälfte der Mäuse erhielt normales Trinkwasser. 5 Kontroll-Mäusen wurden keine Tumore gesetzt. Die Lymphozyten der Milz wurden nach 3 Wochen isoliert und 6 Tage *in vitro* mit Peptid restimuliert. Die Zielzellen wurden radioaktiv markiert und zusammen mit den CTLs inkubiert. Die Lyse der ^{51}Cr -radioaktiv markierten Zielzellen wurde nach 4h Inkubation gemessen. A: Zielzellen: CT26HA. B: Zielzellen: CT26 wt. C: Zielzellen: P815HA.

2.5 Charakterisierung der tumorspezifischen Immunantwort *in vivo*

Die IRF-1 Expression verhindert die Reduktion verschiedener Populationen von Lymphozyten, die in unbehandelten tumortragenden Mäusen zu beobachten waren (Kap. 2.4.1). Außerdem führt die Expression von IRF-1 in Tumoren zu einer erhöhten Anzahl an tumorspezifischen zytotoxischen T-Zellen, die in *in vitro* Experimenten Tumorzellen spezifisch töten können (Abb. 2.17). Es sollte die Frage geklärt werden, ob sich nach Abstoßung des Primärtumors eine tumorspezifische Immunantwort entwickelt hat, die einen ausreichenden Schutz vor einem neuen Tumor bietet.

2.5.1 Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort *in vivo*

Die Injektion von CT26HA-IRF1 Tumorzellen führte zur Bildung von Unterhauttumoren in syngen Mäusen. Durch die Induktion der IRF-1 Expression in den Tumorzellen konnte das Tumorstadium verhindert werden.

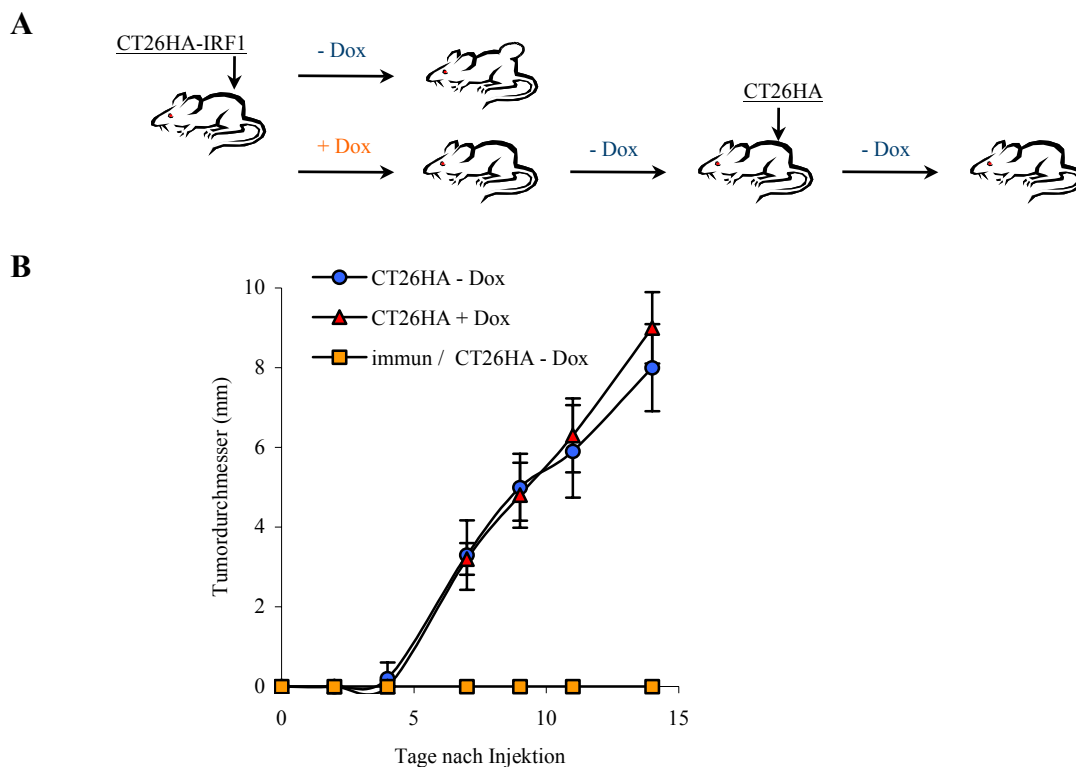


Abb. 2.18 Immunologischer Schutz gegenüber CT26HA Tumoren

5 Balb/c Mäusen wurden 5×10^5 CT26HA-IRF1 Zellen subkutan injiziert und die Mäuse mit Dox-haltigem Trinkwasser (200 $\mu\text{g/ml}$) behandelt. 5 Wochen nach Primärinjektion wurde das Doxyzyklin abgesetzt, 2 Wochen später wurden 5×10^5 CT26HA Zellen kontralateral injiziert. 10 Kontrollmäusen wurden CT26HA Zellen injiziert, die Hälfte erhielt Dox-haltiges Trinkwasser. A: Schematische Darstellung des Maus-Experiments. B: Der mittlere Durchmesser der wachsenden CT26HA Tumore wurde gemessen und das Tumorstadium je Gruppe in Abhängigkeit der Versuchsdauer ermittelt.

Die Mäuse, in denen IRF-1 in Tumorzellen exprimiert wurde, waren zwei Wochen nach der Primärinjektion alle tumorfrei. Nach 5 Wochen wurde das Doxyzyklin im Trinkwasser abgesetzt, um die Expression von IRF-1 einzustellen. Sieben Wochen nach der Injektion des Primärtumors wurden den Mäusen kontralateral CT26HA Tumorzellen injiziert, die kein IRF-1 exprimieren können (Abb. 2.18A). Diese Mäuse entwickelten keine Tumore. Sie waren gegen den Tumor immun, während die Tumore in den Kontrollgruppen stetig wuchsen (Abb. 2.18B). Es konnte somit gezeigt werden, dass die IRF-1 Expression nicht nur die Abstoßung des Primärtumors vermittelt, sondern auch einen Schutz gegenüber einem erneuten Tumor desselben Zelltyps gewährleistet. Die Mäuse sind praktisch gegen den CT26HA Tumor immunisiert worden.

2.5.2 Abstoßung von etablierten Tumoren nach IRF-1 Expression

Die Induktion der IRF-1 Expression in Tumorzellen direkt nach Injektion der Zellen verhindert das Tumorstadium und führt zur Induktion Tumor-spezifischer CTLs. In einigen Mäusen bilden sich kleine Tumore, die nach einiger Zeit aber nicht mehr nachweisbar sind. Eine reale Tumorthherapie, z.B. am Menschen, setzt aber erst nach der Erkennung, also bei bereits etablierten Tumoren an. Es sollte deshalb der Einfluß der IRF-1 Expression in bereits etablierten Tumoren untersucht werden.

Um diese Frage zu klären, wurden Balb/c Mäusen Unterhauttumore gesetzt. Bei Erreichen einer durchschnittlichen Tumorstadium von 5 mm wurde die IRF-1 Expression durch Doxyzyklin-haltiges Trinkwasser in den Tumorzellen induziert (Abb. 2.19A). Zwei Tage nach Induktion der IRF-1 Expression in den Tumoren war bereits eine Reduktion der Tumorstadium im Vergleich zu unbehandelten Mäusen zu messen (Abb. 2.19B). Fünf Tage nach IRF-1 Induktion war der mittlere Durchmesser auf 1 mm reduziert. 60% der behandelten Mäuse stießen den Tumor komplett ab, während bei 40% der Mäuse der Tumor langsam wieder weiter wuchs. Die Tumore der unbehandelten Mäuse wuchsen alle stetig weiter.

Bei den 60% der Doxyzyklin-behandelten Mäuse, die den Primärtumor abgestoßen hatten, wurde fünf Wochen nach der primären Tumorstadium das Doxyzyklin abgesetzt. Nach weiteren drei Wochen wurde ein CT26 wt Sekundärtumor kontralateral injiziert. Die Mäuse blieben tumorfrei, während die Tumore in Kontrollmäusen stetig wuchsen (Abb. 2.19C).

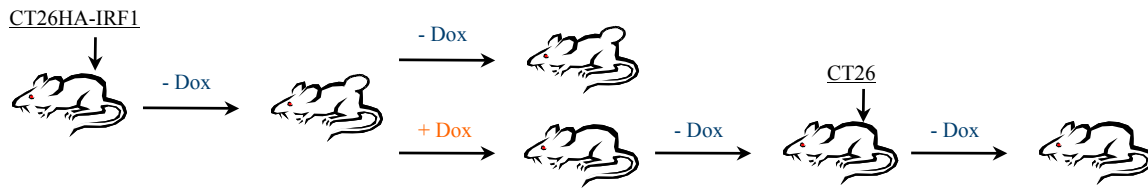
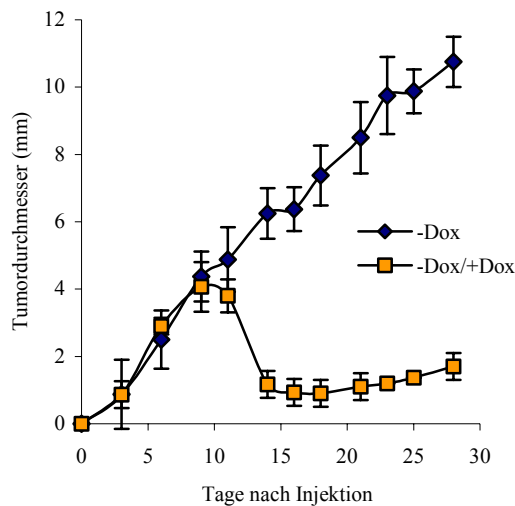
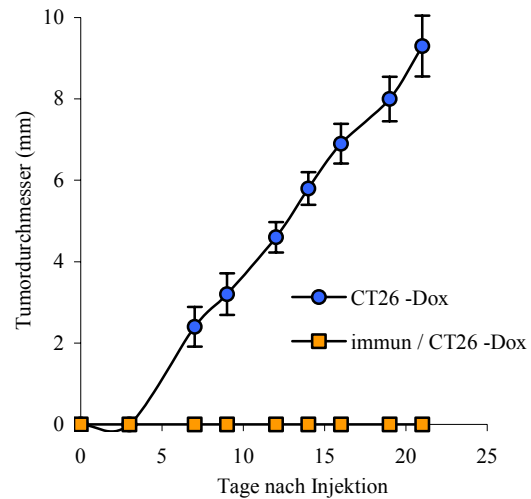
A**B****C**

Abb. 2.19 Einfluß von IRF-1 auf etablierte Tumore

10 Balb/c Mäusen wurden 5×10^5 CT26HA-IRF1 Zellen subkutan injiziert. Nach 9 Tagen wurde die Hälfte der Mäuse mit Doxzyklin-haltigem Trinkwasser (200 µg/ml) behandelt. A: Schematische Darstellung des Balb/c Maus-Experiments B: Der mittlere Durchmesser der wachsenden Tumore wurde gemessen und das Tumorstadium je Gruppe in Abhängigkeit der Versuchsdauer ermittelt.

Die Daten zeigen, dass die Expression von IRF-1 in soliden etablierten Tumoren das Tumorstadium hemmt und zur Abstoßung des Tumors in der Mehrzahl der Mäuse führt. Diese Mäuse weisen einen immunologischen Schutz gegenüber wt Tumoren auf.

2.5.3 Abstoßung von partiell IRF-1 exprimierenden Tumoren

Die Expression von IRF-1 in allen Tumorzellen führt zu einer Verhinderung bzw. Reduktion des Tumorstadiums. Um mit diesem Ansatz natürlich auftretende Tumore zu therapieren, müßte IRF-1 in den Tumorzellen exprimiert werden. Bei einer Gentherapie kann z.B. durch virale Infektion das IRF-1 Gen in die Tumorzellen eingebracht werden. Allerdings werden durch Gentransfer *in vivo* niemals alle Tumorzellen erreicht.

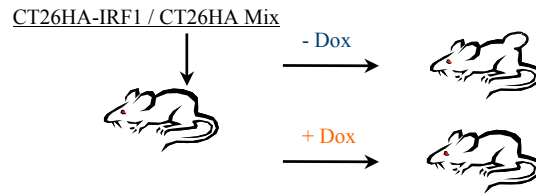
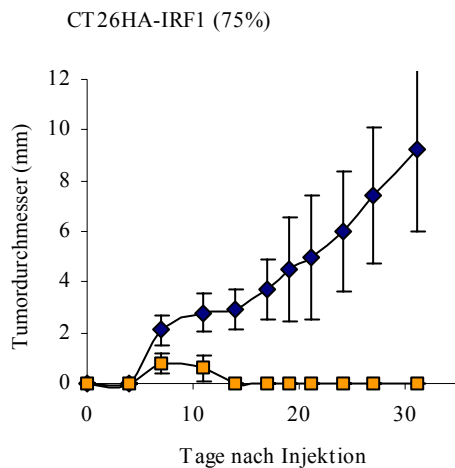
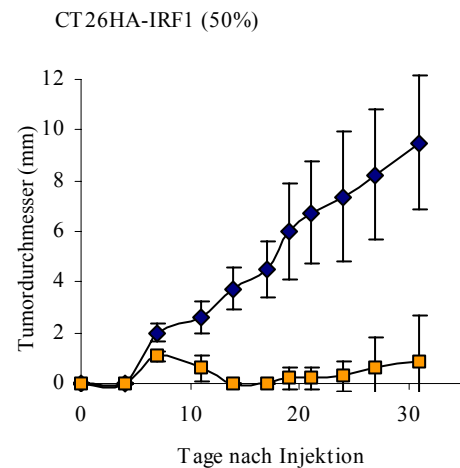
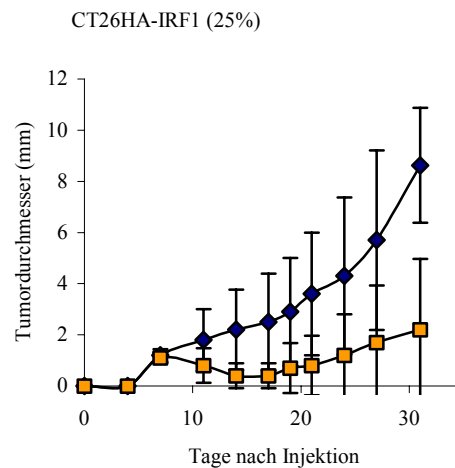
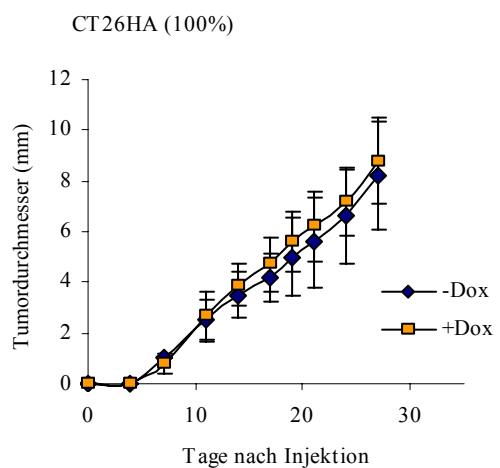
A**B****C****D****E**

Abb. 2.20 Einfluß von IRF-1 auf Tumore, in denen nicht alle Zellen IRF-1 exprimieren

40 Balb/c Mäusen wurden 5×10^5 CT26HA-IRF1/CT26HA Zellen subkutan injiziert, je 5 Mäuse befanden sich in einer Gruppe. Die Hälfte der Mäuse wurde mit Doxzyklin-haltigem Trinkwasser (200 µg/ml) behandelt, die andere Hälfte erhielt normales Trinkwasser. Das Tumorstadium wurde 3 mal pro Woche gemessen. A: Schematische Darstellung des Balb/c Maus-Experiments. B: 75% CT26HA-IRF1 + 25% CT26HA. C: 50% CT26HA-IRF1 + 50% CT26HA. D: 25% CT26HA-IRF1 + 75% CT26HA. E: 100% CT26HA.

Es sollte daher die Frage geklärt werden, ob eine IRF-1 Induktion in nur einem Teil der Zellen eines Tumors ausreicht, um eine tumorverwerfende Immunantwort auszulösen.

Es wurden CT26HA-IRF1 und CT26HA Tumorzellen in verschiedenen Verhältnissen vermischt und diese Zellsuspensionen in Balb/c Mäuse injiziert. Die Tumore wuchsen ohne Induktion von IRF-1 in allen Mäusen an und erreichten nach ca. 4 Wochen einen mittleren Durchmesser von 10 mm (Abb. 2.20). Eine Induktion der Expression von IRF-1 in 75% der Tumorzellen war ausreichend, um die Tumore in allen Mäusen abzustößen (Abb. 2.20B). Wurde IRF-1 in der Hälfte der Tumorzellen (CT26HA-IRF1) exprimiert und in der anderen Hälfte nicht (CT26HA), konnten 80% der Mäuse die Tumore abstoßen (Abb. 2.20C). Bei einer Expressionsrate von IRF-1 in 25% der Tumorzellen stießen 60% der Mäuse die Tumore ab (Abb. 2.20D). Doxyzyklin hatte keinen Einfluß auf das Tumorstadium, da CT26HA Tumore ohne IRF-1 die gleiche Wachstumskinetik mit oder ohne Doxyzyklin-Behandlung zeigten (Abb. 2.20E).

Mit diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass eine Expression von IRF-1 in nur 25% der Tumorzellen ausreicht, um in der Mehrzahl der Mäuse eine tumorverwerfende Immunantwort auszulösen.

3 Diskussion

Das Immunsystem ist in der Lage, transformierte Zellen von normalen Körperzellen zu unterscheiden und zu eliminieren. Ist die Eliminierung jedoch nicht vollständig, werden dadurch aus dem heterogenen Gemisch genetisch instabiler maligner Zellen diejenigen Tumorvarianten selektiert, die vom Immunsystem schlecht oder gar nicht erkannt werden. Ein etablierter Tumor hat die Fähigkeit entwickelt, der Entdeckung und Eliminierung durch das Immunsystem zu entkommen.

Eine effiziente Immuntherapie gegen Krebs erfordert die Induktion einer Tumorspezifischen Immunantwort, die zielgerichtet am Ort des Tumors das immunsuppressive Milieu überwinden und die Toleranz des Immunsystems gegenüber dem Tumor brechen kann und somit die Eliminierung des Tumors bewirkt. Der Interferon Regulatory Factor-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der durch Induktion der Transkription seiner Zielgene seine biologische Wirkung ausübt, die antivirale/-bakterielle, antiproliferative, tumorsuppressive und immunmodulatorische Effekte beinhaltet. Mit dieser Arbeit wurde die Wirkung von IRF-1 auf das Tumorwachstum sowie die Induktion einer tumorspezifischen Immunantwort auch im Hinblick auf die Entwicklung einer IRF-1 basierenden Tumorstoffimpfung untersucht.

3.1 Vergleich zweier Systeme zur konditionellen Expression von IRF-1

Die ektopische Expression von IRF-1 führt zur Inhibition der Proliferation (Kirchhoff et al. 1993), die Herstellung stabil exprimierender Zellklone ist daher nicht möglich. Die Aktivität oder Expression von IRF-1 muss deshalb reguliert werden. Für die regulierte IRF-1 Aktivität/Expression wurden zwei Systeme verwendet: 1. Die Regulation der IRF-1 Aktivität durch ein Östrogen-reguliertes Fusionsprotein (Kirchhoff et al. 1993) und 2. die induzierbare Expression durch das Tet- System (Gossen and Bujard 1992).

Bei Östrogen-regulierten Fusionsproteinen wird das zu regulierende Gen an die Hormonbindedomäne des humanen Östrogenrezeptors (hER) fusioniert. Das Fusionsprotein wird konstitutiv exprimiert, liegt aber in einem inaktiven Zustand vor, in dem HSP90 an den Komplex gebunden ist (Abb. 2.1). Bei der Aktivierung des Fusionsproteins führt die Bindung des Liganden β -Estradiol (E2) zu einer Konformationsänderung, die die Kerntranslokation ermöglicht. Mit Hilfe dieses Systems konnte IRF-1 in Tumorzellen der

Mamma-Adenokarzinomzelllinie TS/A konstitutiv exprimiert und die Aktivität Ligand-abhängig graduell durch Zugabe von E2 reguliert werden.

Bei der verwendeten hER-Domäne handelt es sich um die G400V-Mutante. Diese weist eine niedrigere E2-Affinität auf und kann nicht mehr durch Phenolrot, das im Zellkulturmedium als Indikator verwendet wird, aktiviert werden (Tora et al. 1989). Die Aktivierung von IRF-1 *in vitro* erfolgte mit halbmaximaler Aktivität bei 1 nM E2, eine optimale Aktivierung erfolgte ab 100 nM E2 (Daten nicht gezeigt).

Mit Hilfe dieses Fusionsproteins war die Selektion stabiler, IRF-1hER exprimierender Klone möglich. Die Expression des Fusionsproteins war mit der Expression des endogenen IRF-1 nach Induktion durch IFN- γ vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Die Expression von IRF-1 führt vor allem in transformierten Zellen zur Inhibition der Proliferation und Reversion der Transformation (Tanaka et al. 1994; Kirchhoff and Hauser 1999; Kroger et al. 2003). Diese Wirkung von IRF-1 konnte auch in TS/A Zellen beobachtet werden. Die Aktivierung von IRF-1 in den TS/AIH Zellen führt zu einer Reduktion der Proliferation (Abb. 2.4) und der Reversion des transformierten Phänotyps (Abb. 2.6).

Die Aktivierung des IRF-1hER Fusionsproteins durch intraperitoneale Injektion von E2 konnte bereits in C57L/J Mäusen gezeigt werden. Die Injektion von 1,5 mg E2 führte zur Aktivierung von IRF-1 und zur Abstoßung des Tumors (Kroger et al. 2001). Um die Wirkung von IRF-1 auf das Tumorwachstum zu untersuchen, wurden TS/AIH Zellen subkutan in syngene Balb/c Mäuse injiziert. Die Aktivierung des IRF-1hER Fusionsproteins in TS/A Zellen durch Injektion von E2 hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Tumorwachstum (Daten nicht gezeigt). Um zu untersuchen, ob die erreichte E2-Konzentration im Serum für die Aktivierung des IRF-1hER Fusionsproteins ausreichend war, wurden die E2-Serumkonzentrationen in unbehandelten und behandelten Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der E2-Injektion getestet. Die Analyse zeigte 8 Stunden nach der Injektion eine maximale Konzentration von 3 nM, die nach weiteren 8 Stunden bereits wieder halbiert war (Daten nicht gezeigt). *In vitro* Versuche zeigten aber, dass 100 nM zur optimalen Aktivierung des IRF-1hER Fusionsproteins notwendig sind. Durch Implantation von „E2-releasing Pellets“, die eine hohe konstante Dosis von E2 über einen Zeitraum von 60 Tagen abgaben, wurde der Serumspiegel auf 50 nM erhöht. Die Tumore in den E2-behandelten Mäusen, in denen IRF-1 in den Tumorzellen aktiv war, zeigten eine reduzierte Wachstumsrate, es wurde aber keine vollständige Reduktion der Tumore erzielt (Daten nicht gezeigt). Dies kann zur Ursache haben, dass die Östrogenkonzentration in

Balb/c Mäusen trotz der „Östrogen-Pellets“ nicht ausreicht, um das Fusionsprotein vollständig zu aktivieren, da der onkogene Phänotyp *in vitro* vollständig unterdrückt werden kann. Zusätzlich kann die Behandlung mit Östrogen einen Einfluß auf das Immunsystem der Mäuse haben. Die Behandlung von Mäusen mit E2 führt zu einem Schutz gegen experimentelle autoimmune Encephalomyelitis (EAE) (Bebo et al. 2001). Die behandelten Mäuse wiesen einen erhöhten Anteil des regulatorischen T-Zellkompartiments auf, welches für die Toleranz gegenüber EAE verantwortlich war (Polanczyk et al. 2004). Die Analyse von Lymphozyten aus der Milz der E2-behandelten Mäuse zeigte, dass die Anzahl der Effektor-T-Zellen in diesen Tieren niedriger war als in Kontrollmäusen, während die Anzahl der regulatorischen T-Zellen erhöht war (Daten nicht gezeigt). Die erhöhte Anzahl an Tregs konnte auch in Mäusen nachgewiesen werden, die zwar ein Östrogen-Implantat trugen, aber keine Tumor-Injektion erhalten hatten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die gesteigerte Anzahl an Tregs, die andere Lymphozyten in ihrer Proliferation und Effektorfunktion hemmen können, auf die erhöhten Östrogenspiegel zurückzuführen sein könnte. Außerdem beeinflußt Östrogen CD4⁺ T-Zellen durch Hemmung der IL-2 Induktion und Stimulation der IL-4 und GATA-3 Expression (Lambert et al. 2005). Die Expression von IL-4 und GATA-3 führt in CD4⁺ T-Zellen zur Differenzierung in Th2-Zellen; zur Unterstützung einer tumorspezifischen CTL-Antwort werden aber Th1-Zellen benötigt.

Die Behandlung von Mäusen mit Östrogen führte zu einer Erhöhung der regulatorischen T-Zellen, man kann daher davon ausgehen, dass die Östrogenbehandlung einen direkten Einfluß auf das Immunsystem der Mäuse hatte. Gleichzeitig konnte keine optimale Aktivierung des IRF-1hER Fusionsproteins gewährleistet werden, so dass ein alternatives aktivierbares oder induzierbares Expressionssystem etabliert werden musste.

Eine weiterführende Entwicklung des Östrogen-aktivierbaren Fusionsproteins ist die Tamoxifenmutante. Durch Aminosäure-Austausch wurde die Bindungsaffinität von Östrogen verringert und die von Tamoxifen erhöht (Indra et al. 1999). Tamoxifen ist ein synthetisches Steroid, welches als Medikament mit Anti-Östrogen-Wirkung eingesetzt wird. Mittlerweile gibt es gut regulierte und hoch sensitive Mutanten, so wird dieses System z.B. zur Aktivierung von CRE eingesetzt (Seibler et al. 2003). Von einer Änderung des IRF-1hER Fusionsproteins in ein Tamoxifen-stimulierbares Konstrukt wurde abgesehen, da gezeigt wurde, dass Tamoxifen selbst die Induktion von IRF-1 hervorruft (Bowie et al. 2004).

Um die Wirkung der IRF-1 Expression in Tumorzellen *in vivo* zu untersuchen, wurde deshalb das Tetrazyklin-regulierte Expressionssystem etabliert, welches durch Gossen und Bujard erstmals beschrieben wurde (Gossen and Bujard 1992). Beim Tetrazyklin-regulierten Expressionssystem wird die Expression des Transgens durch einen minimalen CMV-Promotor mit TetO-Sequenzen aus dem Tetrazyklin-Operon aus *E. coli* reguliert. Im TetOn-System nimmt ein synthetischer Transaktivator, bestehend aus einer Fusion der TetO-bindenden Domäne und der VP16 Transaktivierungsdomäne, in Anwesenheit von Tetrazyklin die Konformation zur Bindung des tTA-Promotors und somit zur Initiation der Transkription ein (Gossen et al. 1995). Neben Tetrazyklin können auch dessen Derivate, wie z.B. Doxyzyklin als Induktor fungieren. Der Induktor Tetrazyklin/Doxyzyklin zeigt in den benötigten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Zellen oder Mäuse (Gossen et al. 1995; Baron and Bujard 2000). Die Expression von Transgenen über das Tet-System wurde sowohl für *in vitro* als auch *in vivo* Anwendungen beschrieben (Resnitzky et al. 1994; Gonzalez et al. 2006; Politi et al. 2006). Das Tet-System findet verschiedene Anwendungen *in vivo*. Die Tet-abhängige Transgenexpression in transfizierten Zellen kann z.B. nach Injektion dieser Zellen in Mäusen analysiert werden (Gonzalez et al. 2006), ein weiterer Schritt ist die Herstellung transgener Mäuse mit Gewebe-spezifischer Tet-abhängiger Transgenexpression (Kistner et al. 1996).

Das TetOn-System wurde bereits zur regulierten Expression biologisch aktiver Transgene wie Erythropoetin eingesetzt. Die Aktivierung des Tetrazyklin-regulierten Promotors führte zu einer erhöhten Erythropoetin Expression und somit zu einer Erhöhung des Hämatokritwertes. Allerdings wiesen Mäuse, die nicht mit Tetrazyklin behandelt wurden (uninduzierter Zustand), im Vergleich zu naiven Kontrollmäusen bereits erhöhte Hämatokritwerte auf, was auf eine hohe Basalexpression des Promotors schließen lässt (Bohl et al. 1998; Rizzuto et al. 1999). Eine basale Aktivität des Promotors („Leaky System“) konnte auch für andere Transgene nachgewiesen werden (Rendahl et al. 1998; Mano et al. 2000). Eine deutliche Basalexpression wurde auch in dieser Arbeit über Tet-regulierbares eGFP im FACS nachgewiesen (Abb. 2.2).

Die Verwendung des KRAB Repressors, der in Abwesenheit von Tetrazyklin an die TetO-Sequenzen des tTA-Promotors bindet, führt zu einer geringeren Basalaktivität des Promotors (Deuschle et al. 1995). Tatsächlich konnte die GFP Expression durch die Expression des KRAB Repressors auf das Expressionsniveau nicht veränderter Zellen verringert werden (Abb.2.2). Mit Hilfe dieses Systems wurden CT26HA Darmkarzinom-

zellen hergestellt, die eine strikte Tetrazyklin-regulierte Expression von IRF-1 aufweisen (Abb. 2.3). Die Expression von IRF-1 in den CT26HA-IRF1 Zellen führte zur Inhibition der Proliferation (Abb. 2.4) und zur Reversion des transformierten Phänotyps *in vitro* (Abb. 2.6). Neben der guten Induzierbarkeit der IRF-1 Expression *in vitro* konnte auch eine Tet-regulierte Expression von IRF-1 *in vivo* beobachtet werden. Die mittels Doxycyclin-haltigem Trinkwasser induzierte Expression von IRF-1 in subkutan injizierten Tumorzellen führte zu einer Abstoßung des Tumors in syngen Mäusen (Abb. 2.12).

3.2 Antiproliferative Wirkung durch die Expression von IRF-1

Die Überexpression von IRF-1 inhibiert das Zellwachstum (Kirchhoff et al. 1993). Dieser Effekt ist in Zellen, die durch Onkogene transformiert wurden stärker als in nicht transformierten Zellen (Kroger et al. 2003). Die Aktivierung von IRF-1 in den TS/AIH Tumorzellen und die IRF-1 Expression in den CT26HA-IRF1 Tumorzellen führt zu einer Inhibition der Proliferation (Abb. 2.4).

IRF-1 kann seine antiproliferative Wirkung z.B. durch die Beeinflussung von Regulatoren des Zellzyklus vermitteln. Zellen, die durch die Onkogene c-myc und c-HA-ras transformiert wurden, akkumulieren in der G1-Phase des Zellzyklus (Kroger et al. 2003). Die Akkumulation der Zellen in der G1-Phase wird durch die Inhibition der Zyklin D1 Expression vermittelt. Die Aktivierung der MAP-Kinase MEK1 wird durch IRF-1 verhindert und somit auch die transkriptionelle Induktion von Zyklin D1 (Kroger et al. 2007). Da die Reversion der Transformation in CT26 Tumorzellen gemessen wurde, in diesen Zellen aber keine Verringerung der Zyklin D1 Expression durch IRF-1 detektierbar war, kann Zyklin D1 nicht allein für die Effekte verantwortlich sein (Kröger, persönliche Mitteilung). Der Komplex Zyklin D1/CDK4/6 und der Komplex Zyklin E/CDK2 phosphorylieren kooperativ das pRB Protein, welches die Induktion von E2F vermittelt, das wiederum als Transkriptionsfaktor die Induktion der benötigten Gene zum Übergang der G1-Phase in die S-Phase induziert (Harbour and Dean 2000; Sherr and Roberts 2004). IRF-1 vermittelt die Repression des CDK2 Promotors durch verringerte SP1 Proteinlevel und durch direkte Bindung an den CDK2 Promotor (Xie et al. 2003; Eckert et al. 2006). Die Inhibition von CDK2 könnte ein alternativer Mechanismus für die Inhibition der Proliferation sein. Die Reduktion von CDK2 wurde in myc/ras transformierten, IRF-1 exprimierenden NIH Zellen erst 48 Stunden nach IRF-1 Aktivierung beobachtet, was auf

einen indirekten Mechanismus schließen läßt. Die Expressionslevel von CDK4 und Zyklin E werden durch IRF-1 nicht beeinflusst (Kroger et al. 2007).

Interferone haben auch eine antiproliferative Wirkung. IFN- γ induziert z.B. p21 und p27 (Harvat et al. 1997; Kominsky et al. 1998), welche die Aktivität der CDK2 und CDK4 inhibieren, was zu einer Blockierung der Hyperphosphorylierung von Rb und einem Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase führt (Harvat and Jetten 1996). Außerdem wird der Zellzyklusinhibitor p202 induziert, der durch Bindung an E2F dieses inaktiviert und die Induktion der S-Phase Gene verhindert (Choubey and Gutterman 1997). Die durch Interferone induzierbare PKR inhibiert die Proliferation durch Phosphorylierung von eIF-2, was zur Blockade der Proteinsynthese führt (Meurs et al. 1990; Ramana et al. 2000). Da die IRF-1 vermittelten antiproliferativen Effekte stärker sind als die IFN Effekte (Kroger et al. 2003), können die Interferon-vermittelten Effekte vernachlässigt werden.

Ein anderer möglicher Mechanismus zur antiproliferativen Wirkung von IRF-1 beizutragen, ist die Induktion von Apoptose in den Tumorzellen. IRF-1 kann an der Induktion von Apoptose beteiligt sein. So führte die UV Behandlung von Ha-ras transformierten MEFs zum Zelltod durch Apoptose, die Anzahl apoptotischer IRF-1 KO-Zellen war deutlich verringert (Tanaka et al. 1994). In Mitogen-aktivierten reifen T-Lymphozyten wurde ebenfalls ein durch DNA Schäden induzierter Apoptoseweg gefunden, der IRF-1 abhängig ist. Nach UV Behandlung kommt es durch p53 und IRF-1 zur Induktion der Caspase ICE (Tamura et al. 1995). Die Expression von IRF-1 in EGFR transformierten NIH3T3 Zellen führt zum apoptotischen Zelltod. Der Zelltod kann durch die Expression eines dominant-negativen Stat5 Proteins verhindert werden. Dies zeigt, dass Stat5 an der Induktion der Apoptose beteiligt ist (Kirchhoff and Hauser 1999). In den Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-468 und SK-BR-3 führte die ektopische Expression von IRF-1 zu einer höheren Sensitivität gegenüber der Induktion von Apoptose (Pizzoferrato et al. 2004). Die Induktion von Apoptose wurde außerdem in C3-L5 und TS/A Zellen gezeigt, die mit IRF-1 exprimierenden Adenoviren infiziert wurden (Kim et al. 2004). Dabei führt IRF-1 zu einer erhöhten Aktivität von Caspasen. Die Suppression des Tumorwachstums wurde auf die Induktion von Apoptose in den Tumorzellen zurückgeführt, da die Hemmung der Caspase-Kaskade die Inhibition des Tumorwachstums durch IRF-1 aufhebt. Im Gegensatz dazu war nach Aktivierung bzw. Induktion von IRF-1 in den Tumorzelllinien TS/AIH und CT26HA-IRF1 keine Apoptose nachweisbar. Auch in

myc/ras transformierten NIH Zellen konnten keine Anzeichen von Apoptose entdeckt werden (Kroger et al. 2003).

3.3 Wirkung von IRF-1 auf die Transformation und das Tumorwachstum in immundefizienten Mäusen

IRF-1 revertiert den transformierten Phänotyp von Zellen, die durch die Expression von verschiedenen Onkogenen wie myc, ras, fosb, IRF-2, EGFR oder E1a/b transformiert wurden (Harada et al. 1993; Tanaka et al. 1994; Kirchhoff and Hauser 1999), d.h. die Reversion erfolgt unabhängig von der Art des Onkogens. IRF-1 wirkt nicht nur der Transformation von tumorigenen Zellen entgegen, die durch die ektopische Expression von Onkogenen hervorgerufen wurde, sondern auch von Tumorzelllinien, die aus Tumoren aus der Maus entstanden sind. Die Expression von IRF-1 führt zur Reversion der Transformation in der murinen hepatozellulären Karzinomzelllinie Hepa1-6 (Kroger et al. 2001), der murinen Mamma-Adenokarzinomzelllinie TSA (Kim et al. 2004) und der murinen Sarkomzelllinie MCA 101 (Yim et al. 1997).

In TS/A und CT26HA Zellen führt die Aktivierung bzw. Induktion von IRF-1 zu einer Verringerung der Größe und der Anzahl der Klone in Weichagar (Abb. 2.6). Der Mechanismus, der zur Reversion der Transformation führt, ist unverstanden. Mit Lysyl Oxidase (LOX) wurde ein Enzym der extrazellulären Matrix identifiziert, dass die kovalente Quervernetzung der Vorläufermoleküle von Kollagen und Elastin katalysiert und ein IRF-1 Bindungselement im Promoter aufweist (Tan et al. 1996). Die ektopische Expression von LOX revertiert den transformierten Phänotyp von Ha-ras transformierten Zellen (Contente et al. 1990). In c-myc/Ha-ras transformierten NIH3T3 Zellen konnte allerdings keine Induktion von LOX nachgewiesen werden, außerdem hatte die Expression von LOX keinen Einfluss auf die Transformation.

Auch IFN kann die Transformation inhibieren, die ektopische Expression von IFN- β in PC3M Zellen verhindert das Tumorwachstum in Nacktmäusen. Der inhibitorische Effekt von IFN- β auf die Proliferation der Tumorzellen ist dabei nicht ausreichend. Die IFN- β Sekretion führt zusätzlich zur Stimulierung von NK Zellen, die zur Eliminierung der Tumorzellen beitragen (Dong et al. 1999). Die Aktivierung von NK Zellen und deren tumorsuppressive Funktion konnte auch durch CT26 und B16 Zellen nachgewiesen werden, die IFN- λ überexprimieren (Sato et al. 2006). Im Gegensatz dazu führt die

Induktion von IRF-1 in CT26 Zellen nicht zur Verhinderung des Tumorwachstums in T-Zell-defizienten Nacktmäusen, alle Mäuse entwickelten Tumore (Abb. 2.11). Die Expression von IRF-1 führte lediglich zu einer Verlangsamung des Tumorwachstums. Die Experimente zeigen, dass die Reversion der Transformation *in vitro* nicht mit der *in vivo* vergleichbar ist. Die Aktivierung von IRF-1 führt auch zur Sekretion geringer Mengen von IFN. Diese scheinen allerdings nicht ausreichend zu sein, um NK Zellen zu aktivieren und somit das Tumorwachstum zu verhindern.

3.4 Tumorsuppressive und immunmodulatorische Wirkung von IRF-1 in syngen Mäusen

Die Expression von IRF-1 verhindert das Tumorwachstum in immunkompetenten Mäusen (Abb. 2.12). In syngen immunkompetenten Balb/c Mäusen wurde durch Expression von IRF-1 in den CT26HA-IRF1 Tumorzellen das Anwachsen der Tumore verhindert oder kleine Tumore wurden wieder vollständig abgestoßen. Eine Möglichkeit der Abstoßung von Tumoren *in vivo* ist die Erkennung und Eliminierung der Tumorzellen durch das Immunsystem der Mäuse.

MHC Klasse I Expression: Die Präsentation von Peptiden auf MHC Klasse I Molekülen führt zur Erkennung der Zellen durch CD8+ T-Zellen (Zinkernagel and Doherty 1979; van Bleek and Nathenson 1992). IFN- β und IRF-1 erhöhen die Expression von MHC Klasse I Molekülen auf der Zelloberfläche durch Induktion der MHC Klasse I Genexpression (Chang et al. 1992). IRF-1 vermittelt in den TS/AIH und den CT26HA-IRF1 Zellen eine erhöhte Expression der MHC Klasse I Moleküle auf der Zelloberfläche (Abb. 2.7). Neben der Induktion der MHC Klasse I Moleküle selbst ist IRF-1 auch in die Induktion von Proteinen des Transport- und Prozessierungsweges von MHC Klasse I Peptiden wie LMP-2 und TAP-1 involviert (White et al. 1996). In IRF-1 KO-Mäusen ist die basale Expression von MHC Klasse I in verschiedenen Organen niedriger als in wt Mäusen und auch die MHC Klasse I Induktion durch IFN- γ ist in IRF-1 KO-Mäusen stark beeinträchtigt (Hobart et al. 1996; Hobart et al. 1997).

Eine erhöhte Expression von MHC Klasse I Molekülen sollte zu einer verbesserten Präsentation von Tumorantigenen und somit zur verbesserten Erkennung und Eliminierung der Tumorzellen durch spezifische zytotoxische T-Zellen führen. Tatsächlich führt die Expression von IRF-1 in Tumorzellen zu einer verbesserten Erkennung und Eliminierung

durch Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen (Abb. 2.8). Diese Experimente weisen auf einen IRF-1 vermittelten Effekt hin, dem „Escape“ Mechanismus von Tumorzellen entgegen zu wirken, die eine niedrige Expression von MHC Klasse I Molekülen haben.

Expression von Chemokinen: Zur Bekämpfung eines Tumors oder einer Infektion müssen nicht nur Antigen-spezifische Lymphozyten im Organismus vorhanden sein, sie müssen auch an den Ort des Tumors oder der Infektion gelangen. Immunzellen patrouillieren in der Peripherie des Körpers und können durch bestimmte Signalmoleküle an den Ort eines Tumors gelockt werden, um dort ihre immunologische Wirkung zu entfalten (Moser and Loetscher 2001). Es sollte die Frage geklärt werden, ob die Expression von IRF-1 in Tumoren *in vivo* zur Anlockung von Immunzellen zum Ort des Tumors beitragen kann. In einem „Transwell“-Test konnte gezeigt werden, dass IRF-1 zu einer verbesserten Attraktion von Lymphozyten beiträgt, da die Expression von IRF-1 in Tumorzellen zu einer vermehrten Wanderung von Lymphozyten durch die Membran führte (Abb. 2.10). Die Attraktion der Lymphozyten durch die Membran mußte von sezernierten Faktoren der Tumorzellen vermittelt werden, wie z.B. Zytokinen und Chemokinen, die einen chemischen Gradienten bildeten.

Die Expression von Chemokinen führt zur Anlockung von Lymphozyten (Moser and Loetscher 2001). Die Sekretion von inflammatorischen Chemokinen im peripheren Gewebe, wie z.B. CCL2, CCL5 und CCL7, führt zur Attraktion von T-Zellen, Makrophagen, Leukozyten und Dendritischen Zellen. CCL2 lockt T-Lymphozyten sowie Monozyten und Makrophagen an (Carr et al. 1994; Fuentes et al. 1995). CCL19 ist ein homeostatisches Chemokin, welches beim „Homing“ von Lymphozyten in sekundäre lymphoide Organe eine Rolle spielt (Ebert et al. 2005). Die Expression von IRF-1 führte zur Induktion der CCL2, CCL5, CCL7 und CCL19 mRNA (Abb. 2.9). TNF- α und IFN- γ induzieren synergistisch CCL5 durch Bindung von NF κ -B und IRF-1 an spezifische Bindungsstellen im murinen CCL5 Promotor (Lee et al. 2000). In Makrophagen wird die Transkription von CCL5 synergistisch durch IRF-1 und IRF-8 nach Stimulation mit IFN- γ induziert (Liu and Ma 2006) und ist daher in Makrophagen aus IRF-1 KO-Mäusen stark beeinträchtigt (Liu et al. 2005). IFN- β induziert die Expression von CCL2 und CXCL10. Die CXCL10 Expression ist transkriptionell kontrolliert durch IRF-1 und IRF-2 durch Bindung an ISRE Elemente im CXCL10 Promotor (Buttmann et al. 2007). Die Expression von IRF-1 in den Tumorzellen induziert diese Chemokine (Abb. 2.9).

Neben der Attraktion von Leukozyten spielen Chemokine auch eine Rolle bei der Angiogenese. Das Angiogenese-inhibierende Chemokin CXCL10 zeigte die höchste Induktion durch IRF-1, während das Angiogenese-stimulierende Chemokin CXCL5 nicht beeinflusst wurde (Abb. 2.9). Die Hemmung der Angiogenese ist ein wichtiger Schritt, um das Wachstum eines Tumors zu stoppen, indem die notwendige Blutzufuhr unterbunden wird. CXCL10 reduziert das Tumorstadium durch Inhibition der Angiogenese (Belperio et al. 2000), kann aber auch T-Zellen und Monozyten anlocken (Taub et al. 1993) und eine antitumorale Reaktion auslösen.

Einfluß auf das Immunsystem: Eine IRF-1 vermittelte Verbesserung der Erkennung von Tumorzellen durch das Immunsystem wurde postuliert, da die Expression von IRF-1 in der schwach immunogenen MCA101 Zelllinie die Immunogenität erhöhte (Yim et al. 1997). Die subkutane Injektion von IRF-1 exprimierenden MCA101 Zellen führte in einigen der syngenischen immunkompetenten Mäuse zu einem Schutz vor MCA101 Tumoren. Das Tumorstadium wurde allerdings durch IRF-1 nicht vollständig verhindert, sondern nur verlangsamt (Yim et al. 1997). Die Immunisierung mit IRF-1.1 MCA101 Zellen führte in 80% der Mäuse zu einem immunologischen Schutz vor dem Wachstum von MCA101 Tumoren. Die unvollständige Eliminierung der Tumore kann z.B. auf das verwendete Expressionssystem für IRF-1 zurückzuführen sein. IRF-1 wurde konstitutiv in den MCA 101 Zellen exprimiert. Die wachstumsinhibitorischen IRF-1 Effekte führen aber zu einer negativen Selektion, so dass die IRF-1 Expression gering ist und auf Dauer verloren geht. Die Infektion von TS/A Tumorzellen mit IRF-1 exprimierenden Adenoviren führte zu einer verlängerten Latenzphase und einem verlangsamt Tumorstadium in syngenischen Mäusen (Kim et al. 2004). Aber auch in diesem Modell konnte keine vollständige Reduktion des Tumorstadiums gezeigt werden.

Nach Aktivierung von IRF-1 in IRF-1hER exprimierenden Hepa1-6 Zellen wuchsen in 6 von 8 syngenischen C57L/J Mäusen keine Tumore an, die beiden anderen entwickelten kleine langsam wachsende Tumore (Kroger et al. 2001). Immunisierte Mäuse zeigten einen vollständigen immunologischen Schutz gegenüber Hepa1H oder wt Hepa1-6 Tumoren. Die Depletion von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen zeigte, dass T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen an der Abstoßungsreaktion der Tumore beteiligt sind (Kroger et al. 2001).

T-Zellpopulationen: Die Induktion von IRF-1 in CT26HA-IRF1 Tumoren verhindert die Tumorbildung in syngenischen immunkompetenten Balb/c Mäusen, während Tumore ohne IRF-1 stetig wachsen (Abb. 2.12). In diesen unbehandelten Mäusen wird eine verminderte

Anzahl an CD4⁺ T-Helferzellen und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen in der Milz und dem Tumor-drainierenden Lymphknoten nachgewiesen (Abb. 2.13-15). Stattdessen werden vermehrt aktive CD62L^{low}-exprimierende, Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen detektiert, die für eine Suppression von tumorspezifischen Effektorzellen verantwortlich sein könnten. Regulatorische T-Zellen treten vermehrt in humanen metastatischen Lymphknoten in Melanompatienten auf und inhibieren die Funktion von CD4⁺ Effektorzellen und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (Viguier et al. 2004). IRF-1 exprimierende Tumore wurden in Balb/c Mäusen abgestoßen. Diese Mäuse zeigten eine normale Anzahl an T-Helferzellen und zytotoxischen T-Zellen (CTLs) und nur niedrige Level an aktiven regulatorischen T-Zellen.

Tumorantigen-spezifische T-Zellen: Außerdem sind spezifische zytotoxische T-Zellen nachweisbar, die gegen die Tumorzellen (Abb. 2.17) sowie das endogene Antigen gp70 und das Modellantigen HA gerichtet sind (Abb. 2.16). Die CTLs wurden auf ihre Fähigkeiten getestet, nach Stimulation mit Tumorantigen IFN- γ zu bilden und Tumorzellen durch ihre zytotoxische Aktivität zu eliminieren. Durch die Expression von IRF-1 in den CT26HA-IRF1 Tumorzellen wurde die tumorspezifische Immunantwort unterstützt, da mehr isolierte CTLs aus diesen Mäusen durch Tumorantigen-Stimulation zur IFN- γ Produktion angeregt werden konnten und das zytotoxische Potential gegenüber den Tumorzellen höher war. Aus Mäusen mit Tumoren ohne IRF-1 Expression konnten zwar auch tumorspezifische CTLs isoliert werden, diese zeigten aber ein vermindertes Potential zur Lyse von Tumorzellen. Es wurde also eine tumorspezifische Immunantwort gegen die CT26HA-IRF1 Tumore gebildet, die jedoch nicht stark genug war oder supprimiert wurde, so dass der Tumor dem Immunsystem entkommen konnte. Durch Expression von IRF-1 kippte die Waage zugunsten des Organismus. Es kann daraus geschlossen werden, dass IRF-1 die Ausbildung einer tumorverwerfenden Immunreaktion unterstützt, die sich zum einen gegen das endogene Tumorantigen gp70 richtet und zum anderen gegen das Modelltumorantigen HA. Auch im Hepa1-6 Modell kommt es nach Aktivierung von IRF-1 in den Tumorzellen zur Ausbildung Tumorantigen-spezifischer zytotoxischer T-Zellen, die gegen das gewebespezifische Selbstantigen α -Fetoprotein (AFP) gerichtet sind (Kroger et al. 2001).

Anhaltende protektive Immunität: Mittels „Challenge“-Experimenten konnte außerdem gezeigt werden, dass es zur Ausbildung einer protektiven Immunantwort kommt, die einen wirksamen Schutz vor weiteren CT26 Tumoren bietet. Mäuse, die erfolgreich einen

CT26HA-IRF1 Primärtumor abgestoßen hatten, zeigten eine vollständige tumorprotektive Immunantwort gegen CT26HA Tumore (Abb. 2.18) sowie CT26 Wildtyp Tumore (Abb. 2.19). Die Immunisierung mit HepaIH Zellen führte im HCC Modell ebenfalls zu einer tumorprotektiven Immunantwort gegen Hepa1-6 Wildtyp Tumore (Kroger et al. 2001). Die intratumorale Expression von IRF-1 unterstützt also die Generierung Tumorantigen-spezifischer CTL-Antworten und die Ausbildung eines tumorspezifischen immunologischen Gedächtnisses, welches Schutz vor erneut auftretenden Tumoren der gleichen Tumorfamilie bietet.

3.5 IRF-1 in der Immuntherapie zur Behandlung von Tumoren

Ein etablierter Tumor hat eine Strategie entwickelt, der Erkennung und Eliminierung durch das Immunsystem zu entkommen (Dunn et al. 2002). Für eine erfolgreiche Immuntherapie muß die bestehende Toleranz und Anergie des Immunsystems gegenüber dem Tumor gebrochen und eine tumorverwerfende Immunantwort induziert werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IRF-1 die Entwicklung einer tumorverwerfenden Immunantwort in einem Tumormodell in Mäusen induziert.

Die Expression von IRF-1 in CT26HA-IRF1 Tumorzellen führt zur vollständigen Abstoßung der Tumore (Abb. 2.12). Die Analyse der Lymphozyten ergab, dass Mäuse mit IRF-1 exprimierenden Tumoren mehr Effektor-T-Zellen, weniger aktive regulatorische T-Zellen (Abb. 2.13-15) und vermehrt Tumorantigen-spezifische zytotoxische T-Zellen aufweisen (Abb. 2.16-17) als Mäuse mit unbehandelten Tumoren. Die Expression von IRF-1 in Tumorzellen zeigt also nicht nur einen unterstützenden Einfluß auf die Effektor-T-Zellen, sondern auch einen hemmenden Einfluß auf regulatorische T-Zellen.

Bui et. al. wiesen sowohl in progressiv wachsenden Tumoren als auch in sich zurückbildenden Tumoren Tregs nach, allerdings war das Verhältnis von Tregs zu Effektor T-Zellen entscheidend über Wachstum oder Abstoßung des Tumors durch das Immunsystem (Bui et al. 2006). So führte die Depletion der Tregs zu einer effektiven anti-tumoralen Immunantwort (Yu et al. 2005; Bui et al. 2006). Außerdem ist ein erhöhter Prozentsatz an Foxp3-exprimierenden regulatorischen Zellen in einem Tumor ein Indikator für eine schlechte Prognose beim Menschen (Sato et al. 2005). Konventionelle Immuntherapien versuchen durch Vakzinierung, DC-Transfer oder adoptiven Transfer von T-Zellen eine tumorspezifische Immunantwort zu induzieren. Es wird jedoch immer

deutlicher, dass die Bekämpfung des immunsuppressiven Milieus des Tumors ebenso wichtig ist, um eine Tumor-verwerfende Reaktion auszulösen. Es muß daher ein kombinierter Ansatz gefunden werden, um eine spezifische Immunantwort zu induzieren und gleichzeitig hemmende Einflüsse zu unterbinden.

Ein wichtiger Punkt in der Immuntherapie ist die Etablierung einer anhaltenden Immunität und die Generierung von Gedächtniszellen. Mäuse, die einen IRF-1 exprimierenden Primärtumor abgestoßen haben, sind immun gegenüber einer erneuten Konfrontation mit einem Tumor des gleichen Typs oder mit dem Wildtyp Tumor (Abb. 2.18-19). Einen vollständigen immunologischen Schutz gegenüber HepaIH (IRF-1 exprimierenden Hepa1-6) Tumoren oder Wildtyp Hepa1-6 Tumoren zeigten auch HepaIH immunisierte Mäuse im HCC Modell (Kroger et al. 2001). Diese Experimente zeigen, dass die Expression von IRF-1 in Tumoren nicht nur zu einer Abstoßung des Primärtumors, sondern auch zur Etablierung eines immunologischen Gedächtnisses und somit zum Schutz vor weiteren Tumoren führen kann.

Eine Therapie setzt erst an, wenn ein Tumor diagnostiziert wurde. Es wurde daher untersucht, ob IRF-1 nicht nur das Wachstum neu entstehender Tumore, sondern auch bereits etablierter Tumore stoppen kann. Die Induktion der IRF-1 Expression in etablierten Tumoren führt zu einer vollständigen Abstoßung der Tumore in 60% der Mäuse (Abb. 2.19). Im HCC Modell unterdrückte die ektopische Expression von IRF-1 das Wachstum von HepaIH Tumoren und induzierte eine spezifische Immunantwort gegen das Tumorantigen AFP in syngenesischen Mäusen (Kroger et al. 2001). In etablierten HepaIH Tumoren führte die Aktivierung von IRF-1 zu einem Wachstumsstop des Tumors. In dieser Arbeit konnte eine verbesserte Induktion der tumorprotektiven Immunantwort gezeigt werden, da hier etablierte CT26HA-IRF1 Tumore durch IRF-1 Expression wieder vollständig abgestoßen werden (Abb. 2.19), während im HCC Modell das Tumorstadium lediglich arretiert wurde.

IRF-1 ist ein potentieller Kandidat für die Etablierung einer Immuntherapie gegen Tumore. Zukünftige Experimente sollen daher zeigen, ob durch Gentransfer *in vivo* die systemische Wirkung von IRF-1 zur Tumorthherapie erzielt werden kann. Der Gentransfer mittels Lentiviren ist eine effiziente Methode, Gene *in vivo* in Tumorzellen einzubringen. Die intratumorale Injektion lentiviraler Vpr-codierender Vektoren in AT-84 Tumore, ein murines Karzinom der Mundschleimhaut, führte zur Reduktion der Tumorstadium und zur

kompletten Regression der Tumore in über 40% der Mäuse (Pang et al. 2001). Diese Mäuse waren außerdem gegenüber AT-84 Sekundärtumoren immun.

Bei einer lentiviralen Einbringung von IRF-1 in einen Tumor kann man davon ausgehen, dass nicht alle Tumorzellen getroffen werden. Deshalb sollte untersucht werden, wieviele Zellen in einem Tumor IRF-1 exprimieren müssen, um eine Abstoßung zu induzieren. Eine Expression von IRF-1 in einem Viertel der Tumorzellen ist ausreichend, um in 60% der Mäuse die Abstoßung des Tumors zu induzieren (Abb. 2.20). Eine Therapie mittels lentiviralen Transfers von IRF-1 sollte also möglich sein.

Ein anderer möglicher Therapieansatz ist die Verwendung von IRF-1 als DNA-Vakzine. In einer kooperierenden Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass eine DNA-Vakzine, in der ein Tumorantigen-kodierendes Fragment an eine Stressprotein-bindende Domäne fusioniert wurde, eine tumorverwerfende CTL Antwort induziert (Schirmbeck et al. 2006). Eine Kombination dieser Vakzine mit IRF-1 könnte zu einer Verstärkung der immunologischen Reaktion führen und die Ausbildung des tumorspezifischen immunologischen Gedächtnisses unterstützen.

4 Material und Methoden

4.1 Geräte und Chemikalien

4.1.1 Geräte

Tischzentrifugen	Minifuge Heraeus-Christ, Biofuge pico Eppendorf Centrifuge 5417C Hettich Rontanta/S Hettich Mikro 12-24
Kühlzentrifugen	Sorvall Superspeed RC5-C mit Rotoren SS34, GSA Sorvall RT6000B Minifuge Heraeus-Christ, Biofuge fresco
Ultrazentrifuge	Sorval Combi OTDC mit Rotoren Beckman T150, T10
Speedvac concentrator	Savant Instruments Inc. mit Ölschieber-Vakuumpumpe und Kühlfalle
Photometer	Hitachi U-1100 Thermo Elektron Corporation Multiscan Ex
Fluorometer	Hoefer Dyna Quant 200
Luminometer	Berthold Lumat LB 9501 Berthold Lumat LB 9507
Scintillationszähler	Liquid Scintillation and Luminescence Counter, Wallac, 1450 Mikrobeta Trilux
Horizontal-Elektrophorese	BRL Horizon 58 BRL Horizon 1114 BRL Horizon 2025
Vertikal-Elektrophorese	Biorad Mini Protean II
Blottapparatur	Transblot SD Semi-Dry Biorad
Mikroskop	Olympus CK 2, Leitz Labovort, Zeiss Axiovert TV 135 mit Fluoreszenzvorrichtung Leica DMIL
UV-Kammer	Hanau
Fluoreszenz-Elisa-Reader	Wallace Victor2 1420 Multilabel counter Labsystems Multiskan

Netzgeräte	Biorad Power Pac 300 Desaga Mains Power Supply Unit 1200/200
Durchflusszytometer	FACScan von Becton Dickinson FACSCalibur von Becton Dickinson FACSVantage SE von Becton Dickinson Macintosh Quadra 650
Zellzähler	Schärfe System Casy 1
Zellkultur-Inkubatoren	Forma Scientific Water-jacketed Incubator Modell 3336 Heraeus CO ₂ -Auto-Zero
Cleanbenches	Mecaplex, Sterilcard Hood VBM600 und SG400 Heraeus, HLB 2448 Heraeus, HSP 18
pH-Meter	M 340, Beckmann
PCR-Maschine	Biometra T3 Thermocycler Perkin Elmer DNA Thermal Cyclor 480
Light Cycler	Light Cycler, Roche
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer 5436
Thermoblock	IKA Labortechnik
Laborschüttler	Heidolph IKA-Schüttler MTS 4
Vortex	Scientific Industries Vortex Genie 2
Elektroporator	Biorad Gene Pulser und Pulse Controller
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore Milli-Q

4.1.2 Chemikalien

Die Chemikalien werden von den Firmen Amersham, Bayer, Biolabs, Boehringer, Difco, Flow, Fluka, Gibco, Hoechst, Invitek, Macherey-Nagel, Merck, Peqlab, Pharmacia, Promega, Qiagen, Serva, Sigma, Stratagene und USB bezogen. Die Enzyme liefern Amersham-Buchler, BRL, Biolabs, Boehringer, Pharmacia, Roche Pharma und USB. Oligonukleotidsynthesen werden von der Firma MWG durchgeführt.

4.1.3 Zellkulturmaterial

Das Plastik-Zellkulturmaterial für die eukaryontischen Zellen wird von den Firmen Costar, Gibco, Greiner, Nunc und Seromed bezogen.

4.2 Computerprogramme

Die Texte, Grafiken und Tabellen in dieser Arbeit wurden mit den Programmen Word, Powerpoint und Excel der Firma Microsoft erstellt. Die Bearbeitung von Bilddateien erfolgte mit dem Programm Photoshop 5.0 der Firma Adobe. Zur Entwicklung von Klonierungsschritten, zum Auffinden von PCR-Primer Sequenzen und zur Restriktionskartierung wurde das Programm Vector NTI 6.0 der Firma ATCC verwendet. Die Auswertung der Light Cycler Daten erfolgte mit LightCycler® Software Version 3.5.

4.3 Sterilisation

4.3.1 Sterilisation durch Hitze

Glasgeräte werden 4 h bei 180°C im Trockenschrank sterilisiert. Jegliche Materialien aus Plastik wie Eppendorffgefäße und Pipettenspitzen, Lösungen und Holzstäbe werden 25 min bei 121°C autoklaviert.

4.3.2 Sterilisation durch Filtration

Lösungen, die nicht autoklaviert werden können, werden mit Filtern mit einer Porengröße von 2 µm (Sartorius) sterilisiert.

4.4 Arbeiten mit *E.coli*

4.4.1 Verwendete Stämme

XL1-Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F' proAB, lacIqZM15, Tn10, (tetr)], (Bullock, 1987)
DH10B	F', mcrA, -(mrr hsdRMS-mcrBC), □80dlacZM15, lacX74, deoR, recA1, ara139, (ara, leu)7697, galU, galK, λ-, rpsL, end A1, nupG (Gibco BRL)

4.4.2 Kulturmedien für Bakterien

LB-Medium	10 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l Bacto-Hefeextrakt, 5 g/l NaCl
Ampicillin	50 mg/ml Ampicillin in Ethanol, sterilfiltriert
Kanamycin	100 mg/ml Kanamycin in H ₂ O, sterilfiltriert

4.4.3 Herstellung von Agarplatten

Es werden 15 g Agar (Difco) zu 1 l LB-Medium gegeben und aufgekocht. Nach Abkühlen der Agar-Lösung werden für Ampicillin-haltige Agarplatten 1 ml Ampicillin-Lösung (50 mg/ml), für Kanamycin-haltige Platten 0,5 ml Kanamycin-Lösung (100 mg/ml) zur Agar-Lösung gegeben und diese auf Bakterienplatten verteilt.

4.4.4 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Die Bakterien werden in 5 bis 10 ml LB-Medium unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C über Nacht vorkultiviert. Am nächsten Tag wird die Bakterienkultur zu 1 l LB-Medium gegeben und abermals unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C kultiviert. Die Kultivierung wird beendet, wenn die Bakteriensuspension einen O.D.-Wert von 0,6 bis 0,8 (exponentielle Wachstumsphase) bei 600 nm erreicht. Anschließend wird die Bakteriensuspension in vorgekühlte Zentrifugenbecher gegeben und die Bakterien durch 10 minütige Zentrifugation bei 3000 rpm (GS3-Rotor) und 4°C pelletiert. Nach Resuspension in kaltem, sterilem Wasser und wiederholter Zentrifugation werden die Bakterien in 20 ml kalter, 10%iger Glycerin-Lösung aufgenommen und 15 min bei 3500 rpm (SS34-Rotor) und 4°C zentrifugiert. Die Bakterien werden anschließend in 2 bis 3 ml kalter, 10%iger Glycerin-Lösung resuspendiert, in Aliquots zu 50 µl in Eppendorf-Gefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. Anschließend kann die Kompetenz der Bakterien mit der Transformation eines Standardplasmids bestimmt werden.

4.4.5 Elektrottransformation kompetenter Bakterien

Es werden 50 µl kompetente Bakterien aufgetaut, auf Eis gestellt und mit ca. 1 µl verdünnter DNA-Lösung oder Ligationsansatz versetzt, vermischt und in eine vorgekühlte Transformationsküvette mit 0,2 cm Elektrodenabstand gegeben. Diese wird in der Gene-Pulser-Apparatur einem elektrischen Feld (2,5 kV, 25 µF, 200 Ω) ausgesetzt. Die Impuls-

dauer sollte bei 4 bis 5 ms liegen. Sofort nach Transformation werden die Bakterien in 1 ml SOG-Medium aufgenommen und 30 min unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C inkubiert. Anschließend werden Aliquots der Bakterienkultur auf Agarplatten mit Selektionsmedium ausplattiert und diese über Nacht bei 37°C bis zur Klonbildung kultiviert.

4.4.6 Konservierung von Bakterien

Zur kurzfristigen Lagerung werden Bakterien mit einer Impföse auf Agarplatten ausgestrichen. Nach Inkubation der Platte bei 37°C über Nacht wird diese bei 4°C aufbewahrt. Für eine langfristige Lagerung werden Bakterien über Nacht in LB-Medium unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C kultiviert. Die Bakteriensuspension wird im Verhältnis 1:1 mit 87%iger Glycerin-Lösung vermischt und in Glasgefäßen bei -20°C oder -70°C aufbewahrt.

4.5 Arbeiten mit eukaryontischen Zelllinien

4.5.1 Verwendete Zelllinien und Viren

NIH3T3	embryonale Mausfibroblasten-Zelllinie, ATCC CRL-1658, NIH/Swiss strain
TS/A	spontane MammakarzinomZelllinie, Balb/c strain
CT26	karzinogen-induzierte, undifferenzierte Kolonkarzinom Zelllinie, ATCC CRL-2638, Balb/c strain
P815	Mastozytoma Zelllinie, ATCC TIB-64 TM , DBA/2 strain
LMTK-	Stabile Mausfibroblasten-Zelllinie, Derivat der L929 Zelllinie mit defektem Thymidinkinasegen und BudR-Resistenz, ATCC CCL-1.3 TM , C3H/An strain
VSV	Vesicular Stomatitis Virus, Rhabdoviridae

4.5.2 Grundmedien und Lösungen

DMEM-Grundmedium (Dulbecco's Modification of Eagle's Medium)

13,63 g/l DMEM-Pulver; 3,67 g/l (44mM) NaHCO₃; 2,6 g/l (10mM) HEPES; pH 7,0-7,4

IMDM (Isocove's Modified Dulbecco's Medium)

517,65 g/l IMDM-Pulver; 3,02 g/l NaHCO₃, pH 7,0-7,4

PBS (Phosphate buffered saline)

8 g/l (140mM) NaCl; 0.2

TEP

6 mM EDTA, 0,1-0,2% Trypsin (Gibco) in PBS

100x Pen/Strep

6,06 mg/ml Ampicillin (10.000 U/ml), 10 mg/ml Streptomycin (10mg/ml), zum Lösen mit NaOH auf pH7.4 einstellen (Lagerung bei -20°C)

100x Glutamin

29,23 mg/ml Glutamin (Lagerung bei -20°C)

FCS

JRH Bioscience

G418

100 mg/ml G418 in H₂O, sterilfiltriert, (Lagerung bei -20°C)

Polybrene

4 mg/ml in H₂O, sterilfiltriert

4.5.3 Kulturmedien

Vor Gebrauch wird dem Medium 10 % (v/v) FCS sowie 1 % (v/v) Penicillin-Streptomycin-Lösung und Glutamin zugesetzt und gut gemischt.

Kultivierung in DMEM: NIH3T3, TS/A, CT26, LMTK⁻

Kultivierung in IMDM: P815, murine Lymphozyten

500-1000 µg/ml G418 (Neomycin) von PAA Laboratories gelöst in Wasser wird gegebenenfalls als Selektionszusatz bei der Etablierung und Haltung stabil transfizierter Zelllinien ins Medium gegeben.

Als Induktor wird β-Östradiol von Boehringer Ingelheim gelöst in 50% Ethanol in einer Endkonzentration von 1 µM dem Zellkulturmedium für 24-48 h zugesetzt. Die Interferon-Induktion von murinen Zelllinien wird mit 250 U/ml IFN-γ (Boehringer) und 500 U/ml IFN-β (rekombinantes IFN-β, das durch transfizierte BHK-Zellen sekretiert wird) für 24 h durchgeführt. Doyxyzyklin wird in einer Konzentration von 2µg/ml dem Medium zugesetzt.

4.5.4 Kultivierung von Säugerzellen

Die Zellen werden in geeigneten Kulturgefäßen bei 37°C und 5% CO₂ in einem nassbegasteten Brutschrank in entsprechendem Medium kultiviert. Je nach Zelldichte wird nach 2 bis 5 Tagen das Medium gewechselt. Spätestens nach Erreichen der Konfluenz werden die Zellen passagiert. Zur Passagierung werden die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit TE trypsiniert. Die Zellsuspension wird mit Zellkultur vermisch und auf andere Kulturgefäße verteilt.

4.5.5 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung wird mit dem automatischen Zellzähler CASY1 durchgeführt. Dazu werden die Zellen 1:200 in ein Zählgefäß überführt. Soll neben der Zellzahl auch die Vitalität bestimmt werden, werden die Zellen mittels Neubauer-Zählkammer nach vorheriger Trypan-Blau Färbung gezählt.

4.5.6 Langzeitlagerung von Säugerzellen

Exponentiell wachsende Zellen werden gewaschen, trypsiniert und pelletiert (1000 rpm, 5 min). Das Zellpellet wird in kaltem FCS mit 0,5% DMSO resuspendiert und auf Kryoröhrchen (Bio-Freeze-Vials, Fa. Costar) verteilt. Das Einfrieren erfolgt langsam durch 30 minütige Inkubation auf Eis, gefolgt von mindestens 24 h bei -70°C bevor die Zellen dauerhaft in flüssigem Stickstoff gelagert werden. Das Auftauen der Zellen erfolgt schnell im 37°C-Wasserbad. Zur Entfernung des DMSO werden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und zentrifugiert (1000 rpm, 5 min). Das Zellpellet wird in Kulturmedium resuspendiert und auf Kulturgefäße verteilt.

4.5.7 Bestimmung der Proliferation

Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität werden je 2×10^3 Zellen / 200 µl Medium in die oberste Reihe einer Mikrotiterplatte ausplattiert und 100 µl Medium in die anderen Reihen vorgelegt. Mit einer Multikanalpipette werden 100 µl entnommen, in die zweite Reihe gegeben und so fort, um jeweils eine 1:2-Verdünnung zu erhalten. Nach 24 h werden 100 µl Medium ohne Zusatz (Kontrolle) oder mit 2 µM E2 zur Aktivierung des IRF-1hER Fusionsproteins auf die Zellen gegeben und diese für 7-9 Tage bei 37°C im Brutschrank

inkubiert. Die Anzahl proliferierender Zellen wird mit einem colorimetrischen Assay basierend auf dem Abbau von WST-1 durch mitochondriale Dehydrogenasen in lebenden Zellen nachgewiesen. Nach Abschlagen des alten Mediums wird das WST-1 Reagenz, 1:10 verdünnt in Medium, auf die Zellen gegeben und für ca. 15 min im Brutschrank inkubiert. Die Veränderungen der optischen Dichte werden bei 420 nm im ELISA-Reader gemessen.

4.5.8 Formation von Weichagar-Kolonien

Um den transformierten Status der Zellen zu untersuchen wurde das Kontakt-unabhängige Wachstum im Weichagar untersucht. Hierzu wurden auf 50 µl 0,6% underlay Agar 1×10^3 Zellen in 50 µl 0,3% Overlay Agar ausplattiert und einen Tag später mit 50 µl Medium überschichtet. Die Zellen wurden ohne oder mit 1 µM E2 für 7 Tage inkubiert und die Anzahl sowie Größe der Kolonien unter dem Mikroskop ermittelt.

4.6 Arbeiten mit Lentiviren

4.6.1 Herstellung von Lentiviren

Produktionsmedium: 1x Pen/Strep, 1x Glutamin
 10 % (v/v) FCS (aktiv)
 DMEM-Grundmedium
 20 mM HEPES

Transferplasmid:		7,8 µg
Helferplasmide:	pLP1	5,4 µg
	pLP2	1,8 µg
	pVSV-G	3,0 µg

Tag 1: $3,12 \times 10^6$ 293T-Zellen werden auf 55 cm² Platten ausgesäht.

Tag 2: Die Zellen werden mit dem Transferplasmid und den Helferplasmiden (Vira Power™ Lentiviral Expression System, Invitrogen) mittels CaPO₄-Copräzipitation transient transfiziert.

Tag 3: Das Zellmedium wird durch 5 ml Produktionsmedium ersetzt.

Tag 4/5: Überstehendes Produktionsmedium (Virusüberstand) wird mit einer Spritze aufgesogen und durch einen 0,4 µm Filter filtriert und aliquotiert. 5 ml frisches Medium werden auf die Zellen gegeben und am nächsten Tag erneut der Virusüberstand geerntet. Der gewonnene Virusüberstand wird bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert.

4.6.2 Infektion mit Lentiviren

Der Virusüberstand wird mit Polybren (Endkonzentration 8 µg/mL) versetzt und 250 µl werden auf die zu infizierenden Zellen gegeben. Diese wurden am Vortag der Infektion mit einer Dichte von 0,8x10⁵ Zellen pro 9 cm²-Platte ausgesäht. Nach 24 Stunden wird das Medium gewechselt und 48 Stunden nach Infektion wird die Selektion und Expansion der transduzierten Zellen gestartet.

4.7 Arbeiten mit frisch isolierten murinen Lymphozyten

4.7.1 Isolierung von murinen Lymphozyten aus der Milz

ACK Lyse-Puffer 8,29 g (0,15 M) NH₄Cl, 1 g KHCO₃ (10 mM), 37,2 g (0,1 mM) NA₂EDTA, ad 1 l H₂O, pH 7,2-7,4, steril filtriert

Zur Präparation wird die Milz unter sterilen Bedingungen entnommen, das Organ in eine mit 5 ml PBS/EDTA (2mM) gefüllte Petrischale gelegt und die Lymphozyten mittels einer Kanüle herausgespült. Die Zellen werden in ein Polypropylenröhrchen überführt, bei 1200 rpm für 10 min sedimentiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wird in 1 ml ACK-Puffer aufgenommen und zur Erythrozyten-Lyse 2-3 min bei RT inkubiert. Das Volumen wird auf 14 ml mit IMDM (10% FCS) zum Abstoppen der Reaktion aufgefüllt, die Zellen erneut sedimentiert und das Pellet in 5 ml IMDM Medium aufgenommen.

4.7.2 Isolierung von murinen Lymphozyten aus Lymphknoten

Der Lymphknoten (Ln. Subiliacus) wird unter sterilen Bedingungen entnommen, in eine mit 5 ml PBS/EDTA gefüllte Petrischale gelegt und mit einem sterilen Spritzen-Stempel

durch ein Zellsieb (70 μM) gestrichen. Die Zellen werden bei 1200 rpm für 10 min zentrifugiert und das Pellet in 1 ml IMDM Medium aufgenommen.

4.7.3 Stimulation muriner Lymphozyten in vitro

Die Kultivierung von isolierten murinen Lymphozyten erfolgt in IMDM, versetzt mit 1-10 % (v/v) FCS, 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycinlösung, 1 % (v/v) Glutamin, β -Mercapthoethanol (1:1000), Gentamycin (50 $\mu\text{g/ml}$). Zur spezifischen Stimulation der Zellen in vitro werden je 2×10^7 Lymphozyten in einer stehenden kleinen Zellkulturflasche in 10 ml Medium entweder mit Peptid (1 μM) oder bestrahlten Tumorzellen (2×10^6) für 6-9 Tage im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

4.7.4 Lagerung von Lymphozyten

Zur Lagerung werden die Zellen in IMDM Kulturmedium mit 10% DMSO aufgenommen und auf Kryo-Röhrchen (Bio-Freeze-Vials, Fa. Costar) verteilt. Nach 30 min Inkubation auf Eis werden die Zellen bei -70°C eingefroren. Nach dem Auftauen im 37°C Wasserbad werden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und zur Entfernung des DMSO bei 1000 rpm für 5 min pelletiert. Die Zellen werden anschließend in Kulturmedium aufgenommen und auf Zellkulturgefäße verteilt.

4.8 Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren

4.8.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im analytischen Maßstab

STET-Puffer	80 g/l Sucrose, 0,5% Triton X100, 50 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl (pH 8,0) in H ₂ O
TE-Puffer	mM EDTA, 10mM Tris/HCl in H ₂ O, pH 8,0
Lysozym	10 mg/ml Lysozym in TE-Puffer
Ammoniumacetat	8 M NH ₄ Oac in H ₂ O
TE-Rnase	10 $\mu\text{g/ml}$ RNase A in TE-Puffer

Es werden 1,5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit den zu untersuchenden Bakterien angeimpft und diese für 12 bis 16 Stunden unter Schütteln (180 rpm)

bei 37°C kultiviert. Die Bakterien werden in Eppendorfgläsern 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert und anschließend in 500 µl STET-Puffer resuspendiert und mit 50 µl Lysozym-Lösung versetzt. Nach 2 bis 3 minütiger Inkubation bei RT werden die Bakterien 90 s in einen 95°C heißen Thermoblock erhitzt und anschließend 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das zähflüssige Pellet wird mit Hilfe eines Zahnstochers entfernt. Die klare Lösung wird mit 50 µl Ammoniumacetat-Lösung und 500 µl Isopropanol vermischt und erneut 5 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wird nach kurzem Trocknen bei RT in 50 bis 100 µl TE-RNase-Lösung aufgenommen.

4.8.2 Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab (Quiagen)

Resuspensionspuffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A
Lysepuffer	200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS
Neutralisierungspuffer	3,0 M Kaliumacetat, pH 5,5
Äquilibrationpuffer	750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% (v/v) Isopropanol, 0,15% TritonX100
Waschpuffer	M NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0, 15% (v/v) Isopropanol
Elutionspuffer	1,25 M NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 8,5, 15% (v/v)
Isopropanol	

Es werden 200 ml (Midi-Präparation) bzw. 500 ml (Maxi-Präparation) Antibiotika-haltiges LB-Medium mit den Bakterien angeimpft und über Nacht unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Bakterien 10 min bei 6.000 g und 4°C zentrifugiert und in 4 ml bzw. 10 ml Resuspensionspuffer aufgenommen. Die Bakterien-suspension wird vorsichtig bei RT mit 4 ml bzw. 10 ml Lysepuffer versetzt. Die Lysierung der Bakterien wird nach 5 min durch Zugabe von 4 ml bzw. 10 ml Neutralisierungspuffer abgebrochen. Nach weiteren 20 min Inkubation auf Eis werden die bakteriellen Bestandteile durch 30 minütige Zentrifugation bei 20.000 x g und 4°C abgetrennt. Der Überstand mit Plasmid-DNA wird über Filter auf eine mit 4 ml bzw. 10 ml Äquilibrationpuffer vorbehandelte Anionenaustauschersäule gegeben, die Plasmid-DNA bei bestimmter Salzkonzentration und pH-Wert binden kann. Zur Entfernung von RNA, Proteinen und niedermolekularen Verbindungen wird die Säule zweimal mit 10 ml bzw. 30 ml Waschpuffer gewaschen. Anschließend wird die gebundene Plasmid-DNA mit 5 ml bzw. 10 ml

Elutionspuffer eluiert und in 3,5 ml bzw. 10,5 ml Isopropanol gefällt. Nach 30 minütiger Zentrifugation bei 15.000 x g und 4°C wird die DNA mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Trocknung wird die Plasmid-DNA in TE oder H₂O aufgenommen.

4.8.3 Isolierung von DNA aus Agarosegelen (QIAquick-Kit, Quiagen)

Die zu isolierende DNA wird aus dem Agarose-Gel geschnitten. Das Gelstück wird unter Hochsalzbedingungen bei 50°C für 10 min geschmolzen. Die Lösung wird auf eine Silica-Membran gegeben und bei 13.000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Dabei bindet die DNA an die Säulenmatrix, während die Agarose-Salz-Lösung sedimentiert. Nach Waschen der Säule mit einem Ethanol-haltigem Puffer kann die DNA mittels TE-Puffer oder H₂O durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 1 min eluiert werden.

4.8.4 Isolierung von Gesamt-RNA

Lysepuffer	RLT-Puffer
Waschpuffer	RW1-Puffer, RPE-Puffer

Gesamt-RNA aus Zellen wird mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen gemäß den Anweisungen des Herstellers isoliert. Dieses System basiert auf den selektiven Bindungseigenschaften einer Silicagel-Membran, an welche bis zu 100 µg RNA mit einer Länge von über 200 bp gebunden werden können. Hierzu werden 1×10^7 Zellen geerntet, in 600 µl Mercaptoethanol-haltigem RLT-Puffer homogenisiert und mit 600 µl 70% EtOH gemischt. Dieses Gemisch wird auf die RNeasy Säule gegeben, an der die Gesamt-RNA gebunden wird. Nach einer Zentrifugation von 15 sec bei 10.000 rpm werden Verunreinigungen durch die Applikation von Waschpuffern entfernt. Die Elution der RNA erfolgt in 100 µl H₂O.

4.8.5 Phenolisieren von DNA

Phenol (Fa. Roth)	redestilliertes, in TE-Puffer äquilibriertes Phenol (pH 7,8 bis 8,0), 0,1% (w/v) 8-Hydroxychinolin TE-Puffer
TE-Puffer	0.1 mM EDTA, 10mM Tris/HCl in H ₂ O, pH 8,0

Zur Entfernung von Proteinen aus einer DNA-haltigen Lösung wird diese mit Phenol und Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (24:1) im gleichen Verhältnis versetzt und auf dem Vortexer vermischt. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation (1 min; 13.000 rpm). Die obere wässrige Phase wird abgenommen und erneut mit Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung versetzt, um Phenolreste zu entfernen. Nach erneuter Zentrifugation wird die obere Phase abgenommen und kann weiterverarbeitet werden.

4.8.6 Fällung von DNA

LiCl/Ethanol 0,6 M LiCl in Ethanol (Lagerung bei -20°C)

Die DNA-haltige Lösung wird mit 2fachem Volumen LiCl/Ethanol-Lösung versetzt und für mindestens 10 min bei RT inkubiert. Nach einer Zentrifugation (15 min; 13000 rpm; 4°C) wird die DNA mit 70 %igem Ethanol entsalzt. Anschließend wird die Lösung zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet.

4.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

4.9.1 Photometrische Bestimmung

Die Extinktion von Nukleinsäuren wird photometrisch bei 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von 1 bei einer Schichtdicke der Küvette von 1 cm entspricht annähernd 50 µg DNA bzw. 35 µg RNA in 1 ml Volumen. Hierbei ist die optische Dichte der DNA-Lösung abhängig vom GC-Gehalt. Bei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA mit einem 72 %igen GC-Anteil beträgt die OD 1,04, während bei einem 30 %igen GC-Anteil die OD 0,94 beträgt. Das Verhältnis der bei 260 nm und 280 nm gemessenen Extinktionen sollte für eine sorgfältig präparierte und proteinfreie Nukleinsäure zwischen 1,8 (DNA) und 2,0 (RNA) liegen.

4.10 Modifizierung von DNA

4.10.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die DNA wird mittels Restriktionsenzymen gespalten, wobei die vom Hersteller der Enzyme angegebenen Reaktionsbedingungen wie Puffer oder Temperatur beachtet werden. Die Reaktion kann durch Erhitzen für 20 min bei 65°C bis 80°C oder Phenolisierung abgestoppt werden.

4.10.2 Auffüllen von 5'-überstehenden Enden

10x Klenow-Puffer	50 mM Tris/HCl in H ₂ O, pH7,2, 10 mM MgSO ₄ , 0,1 mM DTT
dNTP-Mix	je 1 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Es werden maximal 1 µg DNA mit 5'-überstehenden Enden mit 3 µl des dNTP-Mixes und 1 U Klenow-Enzym in einem Gesamtvolumen von 50 µl bei 25°C für 30 min inkubiert. Die Reaktion wird durch Erhitzen auf 80°C für 20 min gestoppt.

4.10.3 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

10x Phosphatase-Puffer	500 mM Tris/HCl, pH9,0, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM ZnCl ₂ , 1 mM Spermidin
------------------------	---

Zur Verhinderung der Selbstligation eines gespaltenen Vektors werden überstehende 5'- oder 3'-Enden der DNA-Fragmente mit alkalischer Phosphatase (calf intestine phosphatase = CIP) dephosphoryliert. Zur Dephosphorylierung überstehender 5'-Enden werden in einem Reaktionsansatz von 50 µl Endvolumen 5 µl 10 x Phosphatase-Puffer, 20-100 pmol überstehende 5'-Enden und 1 Unit alkalische Phosphatase 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 1 µl 125 mM EDTA, 1 % SDS gestoppt oder durch Inkubation bei 65°C für 10 Minuten inaktiviert. Zur Dephosphorylierung gleich langer 5'- und 3'-Enden oder überstehender 3'-Enden wird der gleiche Reaktionsansatz erstellt. Der Ansatz wird aber 15 Minuten bei 37°C und anschließend 15 Minuten bei 56°C inkubiert. Nach einer nochmaligen Zugabe von 1 Unit alkalischer Phosphatase werden die Inkubationschritte wiederholt.

4.10.4 Ligation von DNA-Fragmenten

5x Ligase-Puffer 250 mM Tris/HCl, pH7,6, 50 mM MgCl₂, 25% (w/v)
PEG8000, 5 mM ATP, 5 mM DTT

Bei der Ligation verknüpft die T₄-DNA-Ligase DNA-Fragmente, die sowohl kompatible, überstehende als auch glatte Enden besitzen. Dabei kommt es zu einer Phosphodiester-Bindung zwischen den 3'-OH- und den 5'-P-Enden der DNA.

Für die Ligation überstehender, kompatibler Enden werden in einem 10 µl Ansatz ca. 20 fmol eines zuvor gegebenenfalls dephosphorylierten Vektors mit ca. 60 fmol eines DNA-Fragments, 2 µl 5 x Ligase-Puffer und 2 U T₄-DNA-Ligase eingesetzt. Inkubiert wird mindestens 4 Stunden bei Raumtemperatur oder bei 16°C über Nacht. Bei der Ligation mit synthetischen Oligonukleotiden wird mit der 1000-fachen molaren Menge des Fragments ligiert.

4.10.5 Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer 40 mM Tris/Acetate, pH7,5, 20 mM NaOAc, 1 mM EDTA
5x Probenpuffer 15% Ficoll, 50 mM EDTA, 1x TAE, 0,05% Bromphenolblau,
0.05% Xylencyanol

Für ein 1%iges Gel wird 1 g Agarose in kochendem 100 ml TAE-Puffer gelöst und mit 1 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) versetzt. Nachdem Erstarren der Agarose wird diese in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer gesetzt. Die Proben werden mit dem 5x Probenpuffer vermischt und auf das Gel geladen. Zur Abschätzung der Größe von DNA-Fragmenten wird neben dem Proben ein Größenmarker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei ca. 100 V und 30 mA. Anschließend können die aufgetrennten DNA-Fragmente unter UV-Licht (360 nm) betrachtet werden. Zur präparativen Gewinnung von DNA-Fragmenten werden die Banden aus dem Gel geschnitten und unter Zuhilfenahme des QIAquick Kits isoliert (vgl. 4.7.3).

4.11 Charakterisierung von Nukleinsäuren

4.11.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren zur Vermehrung bestimmter DNA-Sequenzen. Für dieses Verfahren muss ein Teil der zu amplifizierenden Sequenz bekannt sein, zu der komplementäre Oligonukleotid-Primer hergestellt werden können. Der Amplifikationsprozess besteht aus drei sich wiederholenden Stufen. Zunächst wird die doppelsträngige DNA bei hoher Temperatur in zwei Einzelstränge zerlegt (Denaturierung). Anschließend binden bei niedriger Temperatur die Oligonukleotid-Primer an die komplementären Sequenzen (Annealing). Durch eine DNA-Polymerase werden die Primer verlängert (Primer-Extension). Danach kann der Zyklus von neuem beginnen. Aufgrund der hohen Temperaturen können nur thermostabile DNA-Polymerasen, wie die Taq-Polymerase verwendet werden. Es werden allerdings auch andere Enzyme verwendet, die eine „proof-reading“ Aktivität aufweisen, so dass im Verlauf des Extensionsprozesses weniger Fehler auftreten.

ExpandTM Long Template PCR (Roche Pharma)

10x PCR-Puffer	13-22,5 mM MgCl ₂ , 500 mM Tris/HCl, pH9,2, 160 mM (NH ₄) ₂ SO ₄
Polymerase-Mix	Taq-Polymerase, Pwo-Polymerase aus <i>Pyrococcus woesei</i> (Korrekturenzym)
10x dNTP-Mix	jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Es werden 4,5 µl des 10x PCR-Puffers mit 2 µl 10mM dNTP-Mix, 5 µl Primer A (10 pmol/µl), 5 µl Primer B (10 pmol/µl) und 5 µl DNA-Template (100 pg Plasmid oder 100 ng HMW-DNA) in einem Gesamtvolumen von 45 µl in einem sterilen PCR-Reaktionsgefäß vermischt. Der Ansatz wird in einer PCR-Maschine auf 95°C für 10 min erhitzt. Dann wird der Ansatz bei 68°C für 10 min inkubiert. In dieser Zeit erfolgt die Zugabe der Polymerasen (1U in 1x PCR-Puffer). Anschließend beginnt die PCR in den beschriebenen drei Stufen, hier als Beispiel: Denaturierung bei 95°C für 60 sec, Annealing der Primer bei 40-60°C für 60 sec, Extension bei 68°C. Die Dauer des letzteren Schrittes hängt von der Länge der zu amplifizierenden Sequenz ab (ca. 1000 bp pro 60 sec). Die Annealing

Temperatur wird durch die Primer-Länge (15-30 bp) und den GC-Gehalt (Optimum bei ca. 50%) bestimmt. Der Zyklus wird 25- bis 35-mal wiederholt.

4.11.2 RT-PCR

RNA wird mittels des SuperscriptTM First-Strand Synthesis System für RT-PCR von Invitrogen revers transkribiert. Hierzu werden 5 µg RNA mit 1 µl 10 mM dNTP-Mix und 1 µl Oligo dT Primer Mix vermischt und mit H₂O auf ein Volumen von 10 µl aufgefüllt. Zur Denaturierung von Sekundärstrukturen wird das RNA-Primer-Gemisch für 5 min bei 65 °C im Thermoblock vorinkubiert und anschließend 1 min auf Eis gestellt. Die Lösung der RT-Reaktion setzt sich aus 2 µl 10x RT Puffer, 4 µl 25mM MgCl₂, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl des RNase-Inhibitors RNase Out zusammen und wird in einem PCR-tube mit dem RNA-Primer Mix gemischt. Nach einer Inkubation von 2 min bei 42°C wird 1 µl Reverse Transkriptase hinzugefügt und die RT-Reaktion erfolgt bei 42°C für 50 min und bei 70°C für 15 min. Das PCR-Produkt kann bei -20°C bis zur weiteren Analyse gelagert werden.

4.11.3 Quantitative Real Time PCR

Der Ansatz für die Real-Time PCR im LightCycler® Roche setzt sich zusammen aus 2 µl cDNA (20-200 ng), je 2 µl forward und reverse Primer (300-900 nM), 11 µl Sybr Green Mix und 5 µl H₂O. Die PCR-Reaktion erfolgt in Glaskapillaren mit einem ersten Denaturierungsschritt von 5 min bei 95°C, gefolgt von 40-50 Amplifikationszyklen. Die Annealing Temperatur kann hierbei je nach Target variieren (58-62°C). Alle Proben werden in Duplikaten analysiert, als Negativ-Kontrolle wird eine Wasserprobe amplifiziert. Die Spezifität der amplifizierten PCR-Produkte wird durch Schmelzkurven-Analyse untersucht.

4.11.4 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierungen werden von der Arbeitsgruppe Genomanalyse der GBF durchgeführt. Pro Sequenzierungsreaktion werden 2 µl Plasmid (0,5 µg / µl) sowie je 10 µl Primer (1 pmol / µl) benötigt.

4.12 Gentransfermethoden

4.12.1 Transfektion mittels Calciumphosphat/DNA Präzipitation

2xHEBS-Puffer	280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1.5 mM Na ₂ HPO ₄ in H ₂ O, pH 7,1
CaCl ₂ -Lösung	2,5 M CaCl ₂ in H ₂ O

5×10^5 Zellen werden pro 9 cm² Platte einen Tag vor Transfektion ausgesät. Für die Transfektion wird in einem 5 ml Röhrchen 150 µl 2x HEBS-Puffer vorgelegt. In einem zweiten Röhrchen werden 15 µl CaCl₂, 5-10 µg DNA und H₂O ($\Sigma = 150 \mu\text{l}$) vermischt. Anschließend wird das DNA-Gemisch unter Vortexen zum HEBS-Puffer getropft. Dies wird für 2-3 min bei Raumtemperatur inkubiert bevor die Präzipitat-Suspension in das Kulturmedium gegeben wird. Nach 12-24 Stunden wird das Medium der Zellen gewechselt. Für eine stabile Transfektion werden die Zellen nach zwei Tagen auf eine mittlere Platte transferiert und mit Selektionsmedium 14 Tage kultiviert.

4.12.2 Transfektion mittels Metafectene

Die Transfektion wird in Übereinstimmung mit den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. $0,8-1 \times 10^5$ Zellen werden pro 6 well ausplattiert und am nächsten Tag transfiziert. Hierzu werden 1-2 µg DNA in 100 µl serum- und antibiotikafreiem Medium aufgenommen, 10 µl Metafectene-Reagenz werden ebenfalls in 100 µl serum- und antibiotikafreiem Medium aufgenommen und die beiden Lösungen anschließend durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinigt. Nach einer Inkubation von 15-20 min wird die Lösung auf die Zellen gegeben und diese über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wird das Medium gewechselt.

4.12.3 Durchführung einer Selektion

Zwei Tage nach der Transfektion werden die Zellen mindestens eins zu drei umgesetzt und mit Selektionsmedium versetzt, das alle 2-3 Tage erneuert wird. Klone erscheinen je nach Selektion und Zelltyp 8-21 Tage später. Die Klone werden, wenn sie Stecknadelkopfgröße erreicht haben, auf der Plattenrückseite mit Hilfe eines Filzstifts markiert, gezählt und die Zählung unter dem Mikroskop kontrolliert. Anschließend können Klone isoliert, als

Mischung weiterverwendet oder subkloniert werden. Die zur Selektion verwendeten Drogenkonzentrationen sind vom Zelltyp abhängig und müssen vorher ausgetestet werden.

4.13 Proteinanalytik

4.13.1 Zellaufschluss

Lysepuffer 9930 μ l 250 mM Tris HCl, pH 7,5, 50 μ l Triton pure, 2 μ l 0,1 M PMSF (Proteinase-Inhibitor)

Zellen einer mittleren Platte werden mit PBS gewaschen und abgeschabt. Das Pellet wird bei -20°C gelagert oder sofort zu Zellextrakten weiterverarbeitet. Hierzu wird das Pellet in 50 μ l Lysepuffer aufgenommen, gut gelöst und gevortext und 10 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 10.000 rpm für 10 min bei 4°C wird der Überstand vorsichtig abgenommen und bei -20°C gelagert.

4.13.2 Proteinbestimmung (BCA-Assay)

Lösung A	1 g BCA (Bicinchoninsäure), 160 mM $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$ (2 g), 7 mM Na_2 -Tartrat (1,6 g), 110 mM NaHCO_3 (0,95 g), 1 N NaOH, pH 11,25, ad 100ml H_2O
Lösung B	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (4 g), ad 100 ml H_2O
Gebrauchslösung	15 ml Lösung A + 0,3 ml Lösung B
Lysozym-Stocklösung	3 mg / ml

In einer Mikrotiterplatte für optische Tests werden in die Löcher der ersten Reihe 190 μ l, in die anderen Reihen jeweils 100 μ l Gebrauchslösung vorgelegt. 10 μ l H_2O als Blank-Wert, sowie der Standardproteinlösung (3 mg/ml Lysozym) bzw. der zu messenden Proteinextrakte werden in die Löcher der ersten Reihe dazu pipettiert. Mit einer Multi-kanalpipette wird gut durchmischt, 100 μ l entnommen und in die zweite Reihe gegeben. So fährt man fort und erhält jeweils eine 1:2-Verdünnung. Nach Inkubation von 10–30 min bei 50°C im Brutschrank kann die Mikrotiterplatte im ELISA-Reader bei 562 nm gemessen werden. Anhand der Standardwerte der Lysozymlösung können die Proteingehalte der Proben berechnet werden.

4.13.3 Polyacrylamid Gelelektrophorese

Kathodenpuffer:	20 mM Tris/HCl (pH 8,25), 20 mM Tricine, 0,02 % SDS
Anodenpuffer:	40 mM Tris/HCl (pH 8,9)
Gelpuffer:	3 M Tris/HCl (pH 8,45), 0,3 % SDS
Auftragspuffer:	50 mM Tris/HCl (pH 6,8), 4 % SDS, 12 % Glycerol, 2 % β -Mercaptoethanol, 0,01 % Serva-Blue

Ein 10 %iges Trenngel wird angesetzt aus 7,1 ml Acrylamid/Bis-Acrylamid (49,5/1,5), 2 ml Glycerin, 5 ml Gelpuffer und 0,9 ml H₂O. Zur Polymerisierung werden 15 μ l TEMED und 150 μ l 10 %iges APS zugesetzt, die Lösung zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisierung wird das Isopropanol entfernt, das Sammelgel in den verbleibenden Raum gegossen und der Kamm zur Taschenbildung eingesetzt. Das Sammelgel setzt sich zusammen aus 1,2 ml Acrylamid/Bis-Acrylamid (49,5/1,5), 1,5 ml Gelpuffer, 3,5 ml H₂O und 10 μ l TEMED sowie 100 μ l 10 %iges APS zur Polymerisation. Das Gel wird nach dem Auspolymerisieren in die Elektrophoresekammer eingesetzt und der Anoden- beziehungsweise Kathodenpuffer eingefüllt. Die Proben werden 5 Minuten im Auftragspuffer bei 90°C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese läuft über Nacht bei 30 V oder bei 120 V für 3-4 Stunden.

4.13.4 Western Blot

Blotpuffer:	25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 15% (v/v) Methanol
TBS-T:	20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 137 mM NaCl, 0,1% Tween-20

Nach der Auftrennung in einem Gelsystem werden die Proteine anschließend im elektrischen Feld auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Nach Absättigung aller freien Bindungsstellen durch Fremdproteine (z.B. BSA oder FCS) erfolgt der Nachweis eines bestimmten Proteins über die spezifische Interaktion mit einem Antikörper.

Nach der Elektrophorese werden das Gel und die Wine Hybond ECL-Membran (Amersham) 10 min in Blotpuffer äquilibriert und 6 Whatman-3MM-Filterpapiere in der Größe eines Gels in Blotpuffer angefeuchtet. In der Semidry-Elektroblot-Apparatur wird die Membran auf drei Lagen Whatman-Papier und das Gel luftblasenfrei auf die Membran

gelegt und mit drei Lagen Whatman-Papier bedeckt. Der Transfer der Proteine erfolgt 30 min bei 10 V. Für den immunologischen Nachweis von gebundenen Proteinen wird die Membran mit 10% FCS oder 3% BSA in TBS-T 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C abgesättigt. Die Inkubation mit dem primären, Protein-spezifischen Antikörper erfolgt für 1 h bei Raumtemperatur. Nach 3-maligem 10 minütigem Waschen mit TBS-T mit 10% FCS wird mit dem sekundären, Antikörper-spezifischen Antikörper (z.B. Ziege anti-Maus-IgG gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, Dianova) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem 3-maligem Waschen werden die Antigen-Antikörper-Komplexe auf der Membran mit Hilfe der "Enhanced Chemilumineszenz" (ECL, Amersham, für Peroxidase) nachgewiesen. Dazu wird je 1 Vol der beiden ECL-Lösungen miteinander vermischt und die Membran 1 min darin inkubiert. Dabei entstehen durch die Oxidation von Luminol Lichtblitze, die durch Exposition eines Films (Hyperfilm ECL, Amersham) sichtbar gemacht werden können. Nach dem Nachweis eines Proteins kann die Membran einige Male gestrippt werden, um weitere Proteine nachzuweisen (u.a. β -Actin als Abgleich). Die Membran wird in Re-Blot Plus mild (1:10 in H₂O) für 20 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert und anschließend 2 x 15 min in TBS-T mit 10% FCS geblockt. Jetzt kann die nächste Inkubation eines Primärantikörpers erfolgen.

4.13.5 Bestimmung der Luciferase-Aktivität

Die Luciferase-Aktivität wurde mittels des Dual-Luciferase-Assay Kits (Dual Luciferase Reporter Assay System, Promega) entsprechend den Angaben des Herstellers bestimmt. Hierzu wurden Zellen mit einem induzierbaren IRF-1 Konstrukt transient transfiziert. Als Kotransfer wurde ein Vektor mit dem Firefly-Luciferase-Gen unter einem IRF-1 abhängigen Promotor, sowie zum Transfektionsabgleich ein Vektor mit dem Renilla-Luciferase-Gen unter einem konstitutiven Promotor transfiziert, um die Aktivität von IRF-1 durch Expressionsinduktion der Firefly-Luciferase zu untersuchen.

4.13.6 Bestimmung von Interferon

Interferon verleiht Säuger-Zellen homologer Spezies antiviralen Schutz. Die Bestimmung von murinem IFN- β erfolgt in LMTK⁻-Zellen. Die Zellen werden auf Mikrotiterplatten in DME-Medium in einer Konzentration 3×10^6 Zellen/96-Loch-Platte ausgesät, so daß die Platten am nächsten Tag konfluent bewachsen sind. Vor Zugabe der Zellüberstände wird

das alte Medium abgeschlagen und pro Loch 100 µl frisches Medium auf die Zellen gegeben. 100 µl der zu testenden Überstände bzw. 100 µl Interferonstandard (1000 IE) werden in die Löcher der ersten Reihe dazu pipettiert. Mit einer Multikanalpipette wird gut durchmischt, 100 µl entnommen und in die zweite Reihe gegeben. So fährt man fort und erhält jeweils eine 1:2-Verdünnung. Die Zellen werden für 24 h inkubiert, das Medium abgeschlagen und je 100 µl einer Virussuspension (DME mit 5 % FCS und 10^4 pfu VSV) pro Loch der Mikrotiterplatte auf die Zellen gegeben. 48 h nach der Infektion der LTMK⁻-Zellen kann die Lyse der nicht oder ungenügend geschützten Zellen im Mikroskop beobachtet werden. Durch visuellen Vergleich mit dem Interferonstandard kann anhand des antiviralen Schutzes der Zellen der Interferongehalt in den einzelnen Proben ermittelt werden.

4.13.7 Durchflusszytometrie (FACS) zur Analyse und Zellsortierung

FACS-Puffer PBS / 2% FCS

Es werden je 5×10^5 Zellen (6well) auf Mikrotiterplatten übertragen und zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgt in 100 µl FACS-Puffer für 30 min auf Eis. Bei direkt gekoppeltem Antikörper wird die Inkubation im Dunkeln durchgeführt, zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und die Zellen für 5 min in 0,5 µg PI / PBS inkubiert. Andernfalls wird der Sekundärantikörper in 100 µl FACS-Puffer für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert, die Proben einmal gewaschen und in PI inkubiert. Nach einmaligem Waschen werden die Zellen in 300 µl FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflußzytometer analysiert oder im Zellsorter sortiert.

Bei der Färbung intrazellulärer Proteine erfolgt nach der Inkubation des Sekundärantikörpers die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen und anschließend Inkubation des direkt gekoppelten Antikörpers gegen das intrazelluläre Protein. Zur Färbung von Foxp3 werden die Zellen in 100 µl Fix/Perm Lösung (Foxp3 staining set, ebioscience) für mindestens 2 h bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen werden mit PBS und Permeabilisierungspuffer (Foxp3 staining set, ebioscience) gewaschen und mit anti-Foxp3 Antikörper für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Permeabilisierungspuffer werden die Zellen im Durchflußzytometer analysiert.

4.14 T-Zell Assays

4.14.1 Nachweis von intrazellulärem IFN γ

Die Milzzellen werden geerntet und bei einer Konzentration ca. 5×10^6 Zellen / ml IMDM mit spezifischem Peptid ($1 \mu\text{M}$) oder Tumorzellen (5×10^6) stimuliert. Zur Akkumulation intrazellulärer Proteine wird Brefedin A, ein Transportblocker, zugegeben und die Zellen für 4-6 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS werden die Zellen auf eine Mikrotiterplatte ausplattiert und mit $50 \mu\text{l}$ CD16/CD32 (AK gegen FC-Rezeptor) in FACS-Puffer für 20 min auf Eis im Dunkeln inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blocken. Die Extrazelluläre Färbung erfolgt mit $50 \mu\text{l}$ CD8 AK (PE-gekoppelt) in FACS-Puffer für 20 min auf Eis. Zweimal wird mit PBS gewaschen, die Zellen aufgelockert und zur Fixierung und Permeabilisierung mit $100 \mu\text{l/well}$ Cytotfix/Cytoperm (BD) für 30 min auf Eis inkubiert. Die zwei Waschschrirte werden mit $200 \mu\text{l}$ 1x BD Perm/Wash Puffer in aqua dest. (Stammlsg. 10%) durchgeführt. Der IFN γ AK (FITC-gekoppelt) wird in Perm/Wash Puffer gelöst und für 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach 2x Waschen mit Perm/Wash Puffer werden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und am FACS-Gerät gemessen.

4.14.2 Cr-Release Assay

Mittels des Chromium-Release Assays wird das zytotoxische Potential von Effektor zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) untersucht, indem diese Effektorzellen spezifisch MHC I-präsentierte Targets erkennen und in den Zielzellen den Apoptose-Signalweg induzieren. Durch vorherige Markierung der Zielzellen mit ^{51}Cr kann durch die Messung des freigesetzten ^{51}Cr im Überstand der Prozentsatz der spezifisch lysierten Zellen ermittelt werden.

Vorbereitung der Zielzellen (Tumorzellen):

Die Zellen werden mit TEP abgelöst, geerntet, in 50 ml Falcons überführt und zweimal mit RPMI $^-$ (Medium ohne FCS) gewaschen, um so an der Oberfläche gebundenes FCS aus dem Kulturmedium zu entfernen. Die Zellzahl wird bestimmt und die Zellen auf 3×10^6 Zellen/ $200 \mu\text{l}$ RPMI $^-$ eingestellt. Nach Zugabe von $100 \mu\text{Ci}$ ^{51}Cr werden die Zellen 60-90 min bei 37°C inkubiert, wobei alle 15 min die Zellen vorsichtig aufgeschüttelt

werden müssen. Anschließend wird zweimal mit RPMI⁺ (Medium mit FCS) gewaschen, um ungebundenes ⁵¹Cr mittels FCS zu entfernen. Die Zellzahl wird bestimmt und die Targets auf eine Konzentration von 2x10⁶ Zellen / ml eingestellt.

Vorbereitung der Effektorzellen (Milzzellen):

Die Zellen werden geerntet, in 15 ml Greiner Röhrchen überführt und die Zellzahl sowie die Zellvitalität (lebende/tote Zellen) mittels Tryphan-Blau-Färbung und Zählung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es wird eine Verdünnungsreihe der murinen Effektorzellen in IMDM hergestellt, um so eine Kinetik der Lyse der murinen Zielzellen zu erlauben. Je 100 µl der Verdünnungsreihe mit abnehmender Konzentration der Effektorzellen (0,5x10⁶, 0,25x10⁶, 0,125x10⁶, 0,06x10⁶ Zellen) werden in 96 well Platten vorgelegt und mit je 50 µl der murinen Zielzellen (1x10⁴) gemischt. Die Zellen liegen nun in einem Verhältnis von 50:1, 25:1, 12,5:1 und 6:1 in Triplikaten vor. Die Targetzellen werden mittels kurzer Zentrifugation auf die Effektorzellen abgesenkt, und die Ansätze anschließend für 4 h bei 37°C und 5% CO₂ Begasung inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen kurz aufgerüttelt und auf die Kontroll-Wells 50 µl einer 2% Triton X100 Lösung zur Ermittlung des Wertes der Maximallyse gegeben. Nach kurzer Zentrifugation werden 30 µl der Überstände aus den 96er Wells entnommen und in eine gekennzeichnete Rundboden-Mikrotiterplatte (PET Platte), in der je 150 µl β-Szintillatorflüssigkeit vorliegen, überführt. Die Rundbodenplatte wird mit einer Folie abgeklebt, für 15 min bei RT geschüttelt und anschließend die Isotop-Freisetzung gemessen. Durch Vergleich von Spontanlyse (natürliche Freisetzung von ⁵¹Cr im Medium) und Maximallyse (50 µl einer 2% TritonX100 Lösung) mit den spezifischen Lysewerten der murinen Lymphozyten wird die spezifische Freisetzung der ⁵¹Cr-Moleküle und damit das lytische Potential der murinen Zellen gegen die unterschiedlichen murinen Zielzellen ermittelt.

Bestimmung des zytotoxischen Potentials muriner T-Zellen (Effektorzellen):

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{(\text{cpm}_{\text{exp}} - \text{cpm}_{\text{spontan}})}{(\text{cpm}_{\text{max}} - \text{cpm}_{\text{spontan}})} \times 100$$

Der Wert cpm_{exp} der gemessenen Isotop-Freisetzung entspricht der durch die Effektorzellen induzierten Lyse der murinen Zielzellen. Die maximale ^{51}Cr -Freisetzung (cpm_{max}) entspricht der Aktivität des Überstands aus Ansätzen, in denen die Zielzellen durch das Detergenz Triton X100 vollständig lysiert wurden. Die Bestimmung der Spontanfreisetzung ($\text{cpm}_{\text{spontan}}$) erfolgt aus Überständen der Zielzellen die nur mit Kulturmedium inkubiert wurden. Die Spontanfreisetzung sollte bei maximal 20% der Maximallyse liegen.

4.15 Tumorstudien in Mäusen

4.15.1 Verwendete Mauslinien

Zur Untersuchung des Einflusses von IRF-1 auf das Tumorstadium *in vivo* werden die entsprechenden Tumorzellen in syngene Mäuse injiziert. Entsprechend ihres Backgrounds werden die TS/A Mammarkarzinomzellen und CT26 Kolonkarzinomzellen in Balb/c Mäuse injiziert. Die Balb/c werden je nach Bedarf bei der Firma Harlan bestellt. Nacktmäuse werden ebenfalls bei der Firma Harlan bestellt. Als Kontrollen bei T-Zell Assays wurden Milzzellen aus Cl4 TCR-HA transgenen Mäusen verwendet, welche an der GBF gezüchtet werden.

4.15.2 Tumorstadium *in vivo*

Bei allen *in vivo* Experimenten werden mindestens 5 Mäuse pro Versuchsgruppe benötigt. Im TS/A Modell werden 1×10^5 TS/AIH Zellen (bzw. TS/A, TS/AHA) subkutan in die rechte Flanke der Balb/c Mäuse injiziert. Zur Aktivierung des IRF-1hER Fusionsproteins wird den Mäusen 1mg E2/100 μl Sonnenblumenöl alle 2-3 Tage intraperitoneal injiziert. In späteren Experimenten wird 3-7 Tage vor der Zellinjektion ein E2-releasing Pellet subkutan auf dem Rücken unter Narkose eingepflanzt, welches über einen Zeitraum von 60 Tagen kontinuierlich Östrogen an den Organismus abgibt.

Im CT26 Modell werden 5×10^5 CT26HA-IRF1 Zellen (bzw. CT26, CT26HA) subkutan in die rechte Flanke der Balb/c Mäuse injiziert. Zur Induktion von IRF-1 erhalten die Mäuse 2mg/ml Doxzyklin-haltiges Trinkwasser, welches 3 mal pro Woche gewechselt wird. Das Tumorstadium wird 3x pro Woche mit einer Schieblehre gemessen und der Durchmesser protokolliert.

4.16 Antikörper

4.16.1 Antikörper für FACS-Analysen

anti-CD3	Bio anti-mouse CD3 (1:300), Molekulare Immunologie
anti-CD4	APC anti-mouse CD4 (1: 300), eBioscience
anti-CD8	PE anti-mouse CD8 (1:800), eBioscience
	FITC anti-mouse CD8 (1:200), Molekulare Immunologie
anti-CD11b	PE anti-mouse CD11b (1:1200), eBioscience
anti-CD11c	Fitc anti-mouse CD11c (1:900), BD Pharmingen
anti-CD16/CD32	Fc-Block, anti -CD16/CD32 (1:500), Mol. Immunologie
anti-CD19	Bio anti-mouse CD19 (1:1800), Molekulare Immunologie
anti-CD25	Bio anti-mouse CD25 (1:300), Molekulare Immunologie
anti-DX5 (CD49b)	FITC anti-mouse DX5 (1:200), eBioscience
anti-CD62L	FITC anti-mouse CD62L (1:200), Molekulare Immunologie
anti-B220	PE anti-mouse B220 (1:300), BD Pharmingen
anti-Foxp3	PE anti-mouse Foxp3 (1:500), eBioscience
anti-IFN γ	FITC anti-mouse IFN γ (1:500), eBioscience
anti-HA	Bio anti-HA (1:1000), Molekulare Immunologie
anti-MHC I	anti H-2K ^b /H-2D ^d (1:200), BD Pharmingen
	anti H-2D ^d (1:200), BD Pharmingen
anti-Bio	StreptAv-PE/Cy5 (1:1500), BD Pharmingen
anti-mouse IgG	anti Mouse IgG-PE (1:1000), Dianova

4.16.2 Antikörper für Western Blots

anti-Actin	anti-Actin (1:10000)
anti-hER	anti-hER (1:300)
anti -IRF-1	M20, anti-IRF-1 (1:200), Santa Cruz
anti-Mouse IgG	anti Mouse IgG-Peroxidase (1:10000), Dianova
anti-Rabbit IgG	anti Rabbit IgG-Peroxidase (1:10000), Dianova
anti-rabbit IgA	anti-rabbit IgA- Peroxidase (1:15000), Dianova

4.17 Vektoren

4.17.1 Verwendete Vektoren

pCMVKRABrtTA	# 2273, A. Kröger, HZI Braunschweig
pJSARGFP	# 2664, J. Seppen
pJSARGFP-Cla	# 2811, A. Kröger, HZI Braunschweig
pTBCIRF-1HSVCT77neo	# 2812, A. Kröger, HZI Braunschweig

4.17.2 Hergestellte Vektoren

pJSCMVkrabrtTA (2273)	Das Fragment CMVKRABrtTA wird aus dem Vektor pCMVKRABrtTA mit SpeI/Klenow und PstI geschnitten und in den mit ClaI/Klenow und PstI geöffneten Vektor pJSARGFP eingefügt.
pJSGFP (2818)	Der Vektor pJSARGFP wird NheI/XbaI geschnitten und ligiert, um emcVIRES und den reversen Transaktivator zu eliminieren.
pJSIRF-1H (2813)	Das murine IRF-1 Fragment wird aus dem pTBCIRF-1HSVCT77neo Vektor mit EcoRI/NheI geschnitten und in den mit EcoRI/SpeI geöffneten Vektor pJSARGFP-Cla eingefügt.

5 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection
ATG	Translationsstart
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytosin
Cdk	cyclin dependent kinase (Cyclin-abhängige Kinase)
CMV	Cytomegalovirus
⁵¹ Cr	⁵¹ Cromium
CTLs	zytotoxische T-Zellen
DME	Dulbecco's modification of Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleotidtriphosphat
Dox	Doxyzyklin
E2	β-Estradiol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	enhanced green fluorescent protein
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FCS	fötales Kälberserum
G	Guanin
G418	Aminoglycosid-2'-Deoxystreptin (Gentamycin-Derivat)
h	Stunde
HCC	Hepatocelluläres Carcinom
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
IH	IRF-1hER
i.p.	intraperitoneal
IRES	internal ribosomal entry site

IRF-1	Interferon Regulatory Factor-1
IRF-1hER	Fusionsprotein IRF-1 / Bindedomäne humaner Östrogenrezeptor
Kap.	Kapitel
kb	1000 Basen
KRAB	KRAB-Repressor (Krüppel-associated box Domäne aus Kox1)
l	Liter
LTR	long terminal repeat
min	Minute
mRNA	messenger RNA
Neo	Neomycinphosphotransferase
ori	origin of replication
pA	polyA
PBS	phosphate buffer saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Polio	Poliovirus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rtTA	Tetrazyklin-abhängiger reverser Transaktivator
rpm	Umdrehungen pro Minute
s.c.	subcutan
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
Tet	Tetrazyklin
TetO	Operatorsequenz des Tetrazyklin-Resistenzsystems
TetOn	Tetrazyklin-abhängiges Expressionssystem
TetR	Tetrazyklin Repressordomäne
Tregs	regulatorische T-Zellen
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen/Volumen (Volumenprozent)
w/v	Gewicht/Volumen (Gewichtsprozent)

Alle nicht aufgeführten Abkürzungen physikalischer Größen und Einheiten entsprechen dem SI-System.

6 Literaturverzeichnis

- Abdollahi, A., K. A. Lord, B. Hoffman-Liebermann and D. A. Liebermann (1991). "Interferon regulatory factor 1 is a myeloid differentiation primary response gene induced by interleukin 6 and leukemia inhibitory factor: role in growth inhibition." Cell Growth Differ **2**(8): 401-7.
- Baron, U. and H. Bujard (2000). "Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances." Methods Enzymol **327**: 401-21.
- Bebo, B. F., Jr., A. Fyfe-Johnson, K. Adlard, A. G. Beam, A. A. Vandenberg and H. Offner (2001). "Low-dose estrogen therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in two different inbred mouse strains." J Immunol **166**(3): 2080-9.
- Belperio, J. A., M. P. Keane, D. A. Arenberg, C. L. Addison, J. E. Ehlert, M. D. Burdick and R. M. Strieter (2000). "CXC chemokines in angiogenesis." J Leukoc Biol **68**(1): 1-8.
- Bohl, D., A. Salvetti, P. Moullier and J. M. Heard (1998). "Control of erythropoietin delivery by doxycycline in mice after intramuscular injection of adeno-associated vector." Blood **92**(5): 1512-7.
- Bouck, N., V. Stellmach and S. C. Hsu (1996). "How tumors become angiogenic." Adv Cancer Res **69**: 135-74.
- Bowie, M. L., E. C. Dietze, J. Delrow, G. R. Bean, M. M. Troch, R. J. Marjoram and V. L. Seewaldt (2004). "Interferon-regulatory factor-1 is critical for tamoxifen-mediated apoptosis in human mammary epithelial cells." Oncogene **23**(54): 8743-55.
- Brenner, H., C. Stegmaier and H. Ziegler (2005). "Long-term survival of cancer patients in Germany achieved by the beginning of the third millenium." Ann Oncol **16**(6): 981-6.
- Bui, J. D., R. Uppaluri, C. S. Hsieh and R. D. Schreiber (2006). "Comparative analysis of regulatory and effector T cells in progressively growing versus rejecting tumors of similar origins." Cancer Res **66**(14): 7301-9.
- Burnet, F. M. (1970). "The concept of immunological surveillance." Prog Exp Tumor Res **13**: 1-27.
- Burnet, M. (1957). "Cancer; a biological approach. I. The processes of control." Br Med J **1**(5022): 779-86.
- Buttmann, M., F. Berberich-Siebelt, E. Serfling and P. Rieckmann (2007). "Interferon-beta is a potent inducer of interferon regulatory factor-1/2-dependent IP-10/CXCL10 expression in primary human endothelial cells." J Vasc Res **44**(1): 51-60.

- Carr, M. W., S. J. Roth, E. Luther, S. S. Rose and T. A. Springer (1994). "Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3652-6.
- Cella, M., D. Jarrossay, F. Facchetti, O. Alebardi, H. Nakajima, A. Lanzavecchia and M. Colonna (1999). "Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon." Nat Med **5**(8): 919-23.
- Chang, C. H., J. Hammer, J. E. Loh, W. L. Fodor and R. A. Flavell (1992). "The activation of major histocompatibility complex class I genes by interferon regulatory factor-1 (IRF-1)." Immunogenetics **35**(6): 378-84.
- Choubey, D. and J. U. Gutterman (1997). "Inhibition of E2F-4/DP-1-stimulated transcription by p202." Oncogene **15**(3): 291-301.
- Christofori, G. and H. Semb (1999). "The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene." Trends Biochem Sci **24**(2): 73-6.
- Coccia, E. M., M. Severa, E. Giacomini, D. Monneron, M. E. Remoli, I. Julkunen, M. Cella, R. Lande and G. Uze (2004). "Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells." Eur J Immunol **34**(3): 796-805.
- Contente, S., K. Kenyon, D. Rimoldi and R. M. Friedman (1990). "Expression of gene rrg is associated with reversion of NIH 3T3 transformed by LTR-c-H-ras." Science **249**(4970): 796-8.
- Counter, C. M., A. A. Avilion, C. E. LeFeuvre, N. G. Stewart, C. W. Greider, C. B. Harley and S. Bacchetti (1992). "Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity." Embo J **11**(5): 1921-9.
- Curtsinger, J. M., J. O. Valenzuela, P. Agarwal, D. Lins and M. F. Mescher (2005). "Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation." J Immunol **174**(8): 4465-9.
- Dannull, J., Z. Su, D. Rizzieri, B. K. Yang, D. Coleman, D. Yancey, A. Zhang, P. Dahm, N. Chao, E. Gilboa and J. Vieweg (2005). "Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells." J Clin Invest **115**(12): 3623-33.
- Deuschle, U., W. K. Meyer and H. J. Thiesen (1995). "Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters." Mol Cell Biol **15**(4): 1907-14.
- Dighe, A. S., E. Richards, L. J. Old and R. D. Schreiber (1994). "Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors." Immunity **1**(6): 447-56.

- Dondi, E., L. Rogge, G. Lutfalla, G. Uze and S. Pellegrini (2003). "Down-modulation of responses to type I IFN upon T cell activation." J Immunol **170**(2): 749-56.
- Dong, Z., G. Greene, C. Pettaway, C. P. Dinney, I. Eue, W. Lu, C. D. Bucana, M. D. Balbay, D. Bielenberg and I. J. Fidler (1999). "Suppression of angiogenesis, tumorigenicity, and metastasis by human prostate cancer cells engineered to produce interferon-beta." Cancer Res **59**(4): 872-9.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old and R. D. Schreiber (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." Nat Immunol **3**(11): 991-8.
- Dyson, N., P. M. Howley, K. Munger and E. Harlow (1989). "The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product." Science **243**(4893): 934-7.
- Ebert, L. M., P. Schaerli and B. Moser (2005). "Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues." Mol Immunol **42**(7): 799-809.
- Eckert, M., S. E. Meek and K. L. Ball (2006). "A novel repressor domain is required for maximal growth inhibition by the IRF-1 tumor suppressor." J Biol Chem.
- Engel, A. M., I. M. Svane, S. Mouritsen, J. Rygaard, J. Clausen and O. Werdelin (1996). "Methylcholanthrene-induced sarcomas in nude mice have short induction times and relatively low levels of surface MHC class I expression." Apmis **104**(9): 629-39.
- Engel, A. M., I. M. Svane, J. Rygaard and O. Werdelin (1997). "MCA sarcomas induced in scid mice are more immunogenic than MCA sarcomas induced in congenic, immunocompetent mice." Scand J Immunol **45**(5): 463-70.
- Engleman, E. G. (2003). "Dendritic cell-based cancer immunotherapy." Semin Oncol **30**(3 Suppl 8): 23-9.
- Evan, G. and T. Littlewood (1998). "A matter of life and cell death." Science **281**(5381): 1317-22.
- Fuentes, M. E., S. K. Durham, M. R. Swerdel, A. C. Lewin, D. S. Barton, J. R. Megill, R. Bravo and S. A. Lira (1995). "Controlled recruitment of monocytes and macrophages to specific organs through transgenic expression of monocyte chemoattractant protein-1." J Immunol **155**(12): 5769-76.
- Fujita, T., L. F. Reis, N. Watanabe, Y. Kimura, T. Taniguchi and J. Vilcek (1989). "Induction of the transcription factor IRF-1 and interferon-beta mRNAs by cytokines and activators of second-messenger pathways." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(24): 9936-40.

- Fujita, T., J. Sakakibara, Y. Sudo, M. Miyamoto, Y. Kimura and T. Taniguchi (1988). "Evidence for a nuclear factor(s), IRF-1, mediating induction and silencing properties to human IFN-beta gene regulatory elements." Embo J **7**(11): 3397-405.
- Gao, S. J., C. Boshoff, S. Jayachandra, R. A. Weiss, Y. Chang and P. S. Moore (1997). "KSHV ORF K9 (vIRF) is an oncogene which inhibits the interferon signaling pathway." Oncogene **15**(16): 1979-85.
- Girardi, M., D. E. Oppenheim, C. R. Steele, J. M. Lewis, E. Glusac, R. Filler, P. Hobby, B. Sutton, R. E. Tigelaar and A. C. Hayday (2001). "Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells." Science **294**(5542): 605-9.
- Gonzalez, L., J. Manuel Garcia-Martinez, A. Calcabrini, M. Teresa Agullo, C. Gamallo Amat, J. Palacios Calvo, A. Aranda and J. Martin-Perez (2006). "Role of c-SRC in human MCF7 breast cancer cell tumorigenesis." J Biol Chem.
- Gossen, M. and H. Bujard (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(12): 5547-51.
- Gossen, M., S. Freundlieb, G. Bender, G. Muller, W. Hillen and H. Bujard (1995). "Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells." Science **268**(5218): 1766-9.
- Gresser, I., C. Maury, F. Vignaux, O. Haller, F. Belardelli and M. G. Tovey (1988). "Antibody to mouse interferon alpha/beta abrogates resistance to the multiplication of Friend erythroleukemia cells in the livers of allogeneic mice." J Exp Med **168**(4): 1271-91.
- Hahn, W. C., C. M. Counter, A. S. Lundberg, R. L. Beijersbergen, M. W. Brooks and R. A. Weinberg (1999). "Creation of human tumour cells with defined genetic elements." Nature **400**(6743): 464-8.
- Hanahan, D. and J. Folkman (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." Cell **86**(3): 353-64.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Harada, H., T. Fujita, M. Miyamoto, Y. Kimura, M. Maruyama, A. Furia, T. Miyata and T. Taniguchi (1989). "Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes." Cell **58**(4): 729-39.
- Harada, H., M. Kitagawa, N. Tanaka, H. Yamamoto, K. Harada, M. Ishihara and T. Taniguchi (1993). "Anti-oncogenic and oncogenic potentials of interferon regulatory factors-1 and -2." Science **259**(5097): 971-4.
- Harada, H., T. Kondo, S. Ogawa, T. Tamura, M. Kitagawa, N. Tanaka, M. S. Lamphier, H. Hirai and T. Taniguchi (1994). "Accelerated exon skipping of IRF-1 mRNA in

- human myelodysplasia/leukemia; a possible mechanism of tumor suppressor inactivation." Oncogene **9**(11): 3313-20.
- Harbour, J. W. and D. C. Dean (2000). "Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis." Nat Cell Biol **2**(4): E65-7.
- Harris, C. C. (1996). "p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective." Carcinogenesis **17**(6): 1187-98.
- Harvat, B. L. and A. M. Jetten (1996). "Gamma-interferon induces an irreversible growth arrest in mid-G1 in mammary epithelial cells which correlates with a block in hyperphosphorylation of retinoblastoma." Cell Growth Differ **7**(3): 289-300.
- Harvat, B. L., P. Seth and A. M. Jetten (1997). "The role of p27Kip1 in gamma interferon-mediated growth arrest of mammary epithelial cells and related defects in mammary carcinoma cells." Oncogene **14**(17): 2111-22.
- Heiser, A., D. Coleman, J. Dannull, D. Yancey, M. A. Maurice, C. D. Lallas, P. Dahm, D. Niedzwiecki, E. Gilboa and J. Vieweg (2002). "Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors." J Clin Invest **109**(3): 409-17.
- Hiroishi, K., T. Tuting and M. T. Lotze (2000). "IFN-alpha-expressing tumor cells enhance generation and promote survival of tumor-specific CTLs." J Immunol **164**(2): 567-72.
- Hobart, M., V. Ramassar, N. Goes, J. Urmson and P. F. Halloran (1996). "The induction of class I and II major histocompatibility complex by allogeneic stimulation is dependent on the transcription factor interferon regulatory factor 1 (IRF-1): observations in IRF-1 knockout mice." Transplantation **62**(12): 1895-901.
- Hobart, M., V. Ramassar, N. Goes, J. Urmson and P. F. Halloran (1997). "IFN regulatory factor-1 plays a central role in the regulation of the expression of class I and II MHC genes in vivo." J Immunol **158**(9): 4260-9.
- Hoshino, K., T. Kaisho, T. Iwabe, O. Takeuchi and S. Akira (2002). "Differential involvement of IFN-beta in Toll-like receptor-stimulated dendritic cell activation." Int Immunol **14**(10): 1225-31.
- Huehn, J. and A. Hamann (2005). "Homing to suppress: address codes for Treg migration." Trends Immunol **26**(12): 632-6.
- Indra, A. K., X. Warot, J. Brocard, J. M. Bornert, J. H. Xiao, P. Chambon and D. Metzger (1999). "Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases." Nucleic Acids Res **27**(22): 4324-7.
- Isaacs, A. and J. Lindenmann (1957). "Virus interference. I. The interferon." Proc R Soc Lond B Biol Sci **147**(927): 258-67.

- Kamijo, R., H. Harada, T. Matsuyama, M. Bosland, J. Gerecitano, D. Shapiro, J. Le, S. I. Koh, T. Kimura, S. J. Green and et al. (1994). "Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages." Science **263**(5153): 1612-5.
- Kaplan, D. H., V. Shankaran, A. S. Dighe, E. Stockert, M. Aguet, L. J. Old and R. D. Schreiber (1998). "Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(13): 7556-61.
- Kaser, A., S. Nagata and H. Tilg (1999). "Interferon alpha augments activation-induced T cell death by upregulation of Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand expression." Cytokine **11**(10): 736-43.
- Katze, M. G., Y. He and M. Gale, Jr. (2002). "Viruses and interferon: a fight for supremacy." Nat Rev Immunol **2**(9): 675-87.
- Kiessling, R., K. Wasserman, S. Horiguchi, K. Kono, J. Sjoberg, P. Pisa and M. Petersson (1999). "Tumor-induced immune dysfunction." Cancer Immunol Immunother **48**(7): 353-62.
- Kim, P. K., M. Armstrong, Y. Liu, P. Yan, B. Bucher, B. S. Zuckerbraun, A. Gambotto, T. R. Billiar and J. H. Yim (2004). "IRF-1 expression induces apoptosis and inhibits tumor growth in mouse mammary cancer cells in vitro and in vivo." Oncogene **23**(5): 1125-35.
- Kirchhoff, S. and H. Hauser (1999). "Cooperative activity between HER oncogenes and the tumor suppressor IRF-1 results in apoptosis." Oncogene **18**(25): 3725-36.
- Kirchhoff, S., A. E. Koromilas, F. Schaper, M. Grashoff, N. Sonenberg and H. Hauser (1995). "IRF-1 induced cell growth inhibition and interferon induction requires the activity of the protein kinase PKR." Oncogene **11**(3): 439-45.
- Kirchhoff, S., A. Oumard, M. Nourbakhsh, B. Z. Levi and H. Hauser (2000). "Interplay between repressing and activating domains defines the transcriptional activity of IRF-1." Eur J Biochem **267**(23): 6753-61.
- Kirchhoff, S., D. Wilhelm, P. Angel and H. Hauser (1999). "NFkappaB activation is required for interferon regulatory factor-1-mediated interferon beta induction." Eur J Biochem **261**(2): 546-54.
- Kirchhoff, S., F. Schaper and H. Hauser (1993). "Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) mediates cell growth inhibition by transactivation of downstream target genes." Nucleic Acids Res **21**(12): 2881-9.
- Kirchhoff, S., M. Koster, M. Wirth, F. Schaper, M. Gossen, H. Bujard and H. Hauser (1995). "Identification of mammalian cell clones exhibiting highly regulated expression from inducible promoters." Trends Genet **11**(6): 219-20.

- Kistner, A., M. Gossen, F. Zimmermann, J. Jerecic, C. Ullmer, H. Lubbert and H. Bujard (1996). "Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 10933-8.
- Kominsky, S., H. M. Johnson, G. Bryan, T. Tanabe, A. C. Hobeika, P. S. Subramaniam and B. Torres (1998). "IFN γ inhibition of cell growth in glioblastomas correlates with increased levels of the cyclin dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1." Oncogene **17**(23): 2973-9.
- Kondo, T., N. Minamino, T. Nagamura-Inoue, M. Matsumoto, T. Taniguchi and N. Tanaka (1997). "Identification and characterization of nucleophosmin/B23/numatrin which binds the anti-oncogenic transcription factor IRF-1 and manifests oncogenic activity." Oncogene **15**(11): 1275-81.
- Kroger, A., A. Dallugge, S. Kirchhoff and H. Hauser (2003). "IRF-1 reverts the transformed phenotype of oncogenically transformed cells in vitro and in vivo." Oncogene **22**(7): 1045-56.
- Kroger, A., D. Ortmann, T. U. Krohne, L. Mohr, H. E. Blum, H. Hauser and M. Geissler (2001). "Growth suppression of the hepatocellular carcinoma cell line Hepa1-6 by an activatable interferon regulatory factor-1 in mice." Cancer Res **61**(6): 2609-17.
- Kroger, A., A. Stirnweiss, J. E. Pulverer, K. Klages, M. Grashoff, J. Reimann and H. Hauser (2007). "Tumor suppression by IFN regulatory factor-1 is mediated by transcriptional down-regulation of cyclin D1." Cancer Res **67**(7): 2972-81.
- Kroger, A., M. Koster, K. Schroeder, H. Hauser and P. P. Mueller (2002). "Activities of IRF-1." J Interferon Cytokine Res **22**(1): 5-14.
- Lambert, K. C., E. M. Curran, B. M. Judy, G. N. Milligan, D. B. Lubahn and D. M. Estes (2005). "Estrogen receptor alpha (ER α) deficiency in macrophages results in increased stimulation of CD4⁺ T cells while 17 β -estradiol acts through ER α to increase IL-4 and GATA-3 expression in CD4⁺ T cells independent of antigen presentation." J Immunol **175**(9): 5716-23.
- Lee, A. H., J. H. Hong and Y. S. Seo (2000). "Tumour necrosis factor- α and interferon- γ synergistically activate the RANTES promoter through nuclear factor κ B and interferon regulatory factor 1 (IRF-1) transcription factors." Biochem J **350 Pt 1**: 131-8.
- Liu, J., X. Guan and X. Ma (2005). "Interferon regulatory factor 1 is an essential and direct transcriptional activator for interferon γ -induced RANTES/CCl5 expression in macrophages." J Biol Chem **280**(26): 24347-55.
- Liu, J. and X. Ma (2006). "Interferon regulatory factor 8 regulates RANTES gene transcription in cooperation with interferon regulatory factor-1, NF- κ B, and PU.1." J Biol Chem **281**(28): 19188-95.

- Lohoff, M., D. Ferrick, H. W. Mittrucker, G. S. Duncan, S. Bischof, M. Rollinghoff and T. W. Mak (1997). "Interferon regulatory factor-1 is required for a T helper 1 immune response in vivo." Immunity **6**(6): 681-9.
- Lombardi, G., P. J. Dunne, D. Scheel-Toellner, T. Sanyal, D. Pilling, L. S. Taams, P. Life, J. M. Lord, M. Salmon and A. N. Akbar (2000). "Type 1 IFN maintains the survival of anergic CD4⁺ T cells." J Immunol **165**(7): 3782-9.
- Mano, T., Z. Luo, T. Suhara, R. C. Smith, S. Esser and K. Walsh (2000). "Expression of wild-type and noncleavable Fas ligand by tetracycline-regulated adenoviral vectors to limit intimal hyperplasia in vascular lesions." Hum Gene Ther **11**(12): 1625-35.
- Meurs, E., K. Chong, J. Galabru, N. S. Thomas, I. M. Kerr, B. R. Williams and A. G. Hovanessian (1990). "Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon." Cell **62**(2): 379-90.
- Markowitz, S., J. Wang, L. Myeroff, R. Parsons, L. Sun, J. Lutterbaugh, R. S. Fan, E. Zborowska, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and et al. (1995). "Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability." Science **268**(5215): 1336-8.
- Medema, J. P., J. de Jong, T. van Hall, C. J. Melief and R. Offringa (1999). "Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein." J Exp Med **190**(7): 1033-8.
- Miyamoto, M., T. Fujita, Y. Kimura, M. Maruyama, H. Harada, Y. Sudo, T. Miyata and T. Taniguchi (1988). "Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN-beta gene regulatory elements." Cell **54**(6): 903-13.
- Moore, P. S., C. Boshoff, R. A. Weiss and Y. Chang (1996). "Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV." Science **274**(5293): 1739-44.
- Morgan, D. J., R. Liblau, B. Scott, S. Fleck, H. O. McDevitt, N. Sarvetnick, D. Lo and L. A. Sherman (1996). "CD8(+) T cell-mediated spontaneous diabetes in neonatal mice." J Immunol **157**(3): 978-83.
- Moser, B. and P. Loetscher (2001). "Lymphocyte traffic control by chemokines." Nat Immunol **2**(2): 123-8.
- Nanni, P., C. de Giovanni, P. L. Lollini, G. Nicoletti and G. Prodi (1983). "TS/A: a new metastasizing cell line from a BALB/c spontaneous mammary adenocarcinoma." Clin Exp Metastasis **1**(4): 373-80.
- Nozawa, H., E. Oda, K. Nakao, M. Ishihara, S. Ueda, T. Yokochi, K. Ogasawara, Y. Nakatsuru, S. Shimizu, Y. Ohira, K. Hioki, S. Aizawa, T. Ishikawa, M. Katsuki, T. Muto, T. Taniguchi and N. Tanaka (1999). "Loss of transcription factor IRF-1 affects tumor susceptibility in mice carrying the Ha-ras transgene or nullizygosity for p53." Genes Dev **13**(10): 1240-5.

- Nozawa, H., E. Oda, S. Ueda, G. Tamura, C. Maesawa, T. Muto, T. Taniguchi and N. Tanaka (1998). "Functionally inactivating point mutation in the tumor-suppressor IRF-1 gene identified in human gastric cancer." *Int J Cancer* **77**(4): 522-7.
- Ohteki, T., H. Yoshida, T. Matsuyama, G. S. Duncan, T. W. Mak and P. S. Ohashi (1998). "The transcription factor interferon regulatory factor 1 (IRF-1) is important during the maturation of natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ (NK1+ T) cells, natural killer cells, and intestinal intraepithelial T cells." *J Exp Med* **187**(6): 967-72.
- Onoguchi, K., M. Yoneyama, A. Takemura, S. Akira, T. Taniguchi, H. Namiki and T. Fujita (2007). "Viral infections activate types I and III interferon genes through a common mechanism." *J Biol Chem* **282**(10): 7576-81.
- Pang, S., M. K. Kang, S. Kung, D. Yu, A. Lee, B. Poon, I. S. Chen, B. Lindemann and N. H. Park (2001). "Anticancer effect of a lentiviral vector capable of expressing HIV-1 Vpr." *Clin Cancer Res* **7**(11): 3567-73.
- Penninger, J. M., C. Sirard, H. W. Mittrucker, A. Chidgey, I. Kozieradzki, M. Nghiem, A. Hakem, T. Kimura, E. Timms, R. Boyd, T. Taniguchi, T. Matsuyama and T. W. Mak (1997). "The interferon regulatory transcription factor IRF-1 controls positive and negative selection of CD8+ thymocytes." *Immunity* **7**(2): 243-54.
- Petricoin, E. F., 3rd, S. Ito, B. L. Williams, S. Audet, L. F. Stancato, A. Gamero, K. Clouse, P. Grimley, A. Weiss, J. Beeler, D. S. Finbloom, E. W. Shores, R. Abraham and A. C. Larner (1997). "Antiproliferative action of interferon-alpha requires components of T-cell-receptor signalling." *Nature* **390**(6660): 629-32.
- Picard, D. (1993). "Steroid-binding domains for regulating the functions of heterologous proteins in cis." *Trends Cell Biol* **3**(8): 278-80.
- Pizzoferrato, E., Y. Liu, A. Gambotto, M. J. Armstrong, M. T. Stang, W. E. Gooding, S. M. Alber, S. H. Shand, S. C. Watkins, W. J. Storkus and J. H. Yim (2004). "Ectopic expression of interferon regulatory factor-1 promotes human breast cancer cell death and results in reduced expression of survivin." *Cancer Res* **64**(22): 8381-8.
- Platanias, L. C. (2005). "Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling." *Nat Rev Immunol* **5**(5): 375-86.
- Polanczyk, M. J., B. D. Carson, S. Subramanian, M. Afentoulis, A. A. Vandenbark, S. F. Ziegler and H. Offner (2004). "Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment." *J Immunol* **173**(4): 2227-30.
- Politi, K., M. F. Zakowski, P. D. Fan, E. A. Schonfeld, W. Pao and H. E. Varmus (2006). "Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGF receptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors." *Genes Dev* **20**(11): 1496-510.

- Ramana, C. V., N. Grammatikakis, M. Chernov, H. Nguyen, K. C. Goh, B. R. Williams and G. R. Stark (2000). "Regulation of c-myc expression by IFN-gamma through Stat1-dependent and -independent pathways." Embo J **19**(2): 263-72.
- Rendahl, K. G., S. E. Leff, G. R. Otten, S. K. Spratt, D. Bohl, M. Van Roey, B. A. Donahue, L. K. Cohen, R. J. Mandel, O. Danos and R. O. Snyder (1998). "Regulation of gene expression in vivo following transduction by two separate rAAV vectors." Nat Biotechnol **16**(8): 757-61.
- Resnitzky, D., M. Gossen, H. Bujard and S. I. Reed (1994). "Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system." Mol Cell Biol **14**(3): 1669-79.
- Rizzuto, G., M. Cappelletti, D. Maione, R. Savino, D. Lazzaro, P. Costa, I. Mathiesen, R. Cortese, G. Ciliberto, R. Laufer, N. La Monica and E. Fattori (1999). "Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(11): 6417-22.
- Rosenberg, S. A., J. C. Yang, D. J. Schwartzentruber, P. Hwu, F. M. Marincola, S. L. Topalian, N. P. Restifo, M. E. Dudley, S. L. Schwarz, P. J. Spiess, J. R. Wunderlich, M. R. Parkhurst, Y. Kawakami, C. A. Seipp, J. H. Einhorn and D. E. White (1998). "Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma." Nat Med **4**(3): 321-7.
- Rygaard, J. and C. O. Povlsen (1974). "The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours. An argument against immunological surveillance." Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol **82**(1): 99-106.
- Sato, A., M. Ohtsuki, M. Hata, E. Kobayashi and T. Murakami (2006). "Antitumor activity of IFN-lambda in murine tumor models." J Immunol **176**(12): 7686-94.
- Sato, K., S. Hida, H. Takayanagi, T. Yokochi, N. Kayagaki, K. Takeda, H. Yagita, K. Okumura, N. Tanaka, T. Taniguchi and K. Ogasawara (2001). "Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta." Eur J Immunol **31**(11): 3138-46.
- Sato, E., S. H. Olson, J. Ahn, B. Bundy, H. Nishikawa, F. Qian, A. A. Jungbluth, D. Frosina, S. Gnjjatic, C. Ambrosone, J. Kepner, T. Odunsi, G. Ritter, S. Lele, Y. T. Chen, H. Ohtani, L. J. Old and K. Odunsi (2005). "Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(51): 18538-43.
- Schirmbeck, R., P. Riedl, M. Kupferschmitt, U. Wegenka, H. Hauser, J. Rice, A. Kroger and J. Reimann (2006). "Priming protective CD8 T cell immunity by DNA vaccines encoding chimeric, stress protein-capturing tumor-associated antigen." J Immunol **177**(3): 1534-42.

- Schroder, K., P. J. Hertzog, T. Ravasi and D. A. Hume (2004). "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions." J Leukoc Biol **75**(2): 163-89.
- Scott, B., R. Liblau, S. Degermann, L. A. Marconi, L. Ogata, A. J. Caton, H. O. McDevitt and D. Lo (1994). "A role for non-MHC genetic polymorphism in susceptibility to spontaneous autoimmunity." Immunity **1**(1): 73-83.
- Seibler, J., B. Zevnik, B. Kuter-Luks, S. Andreas, H. Kern, T. Hennek, A. Rode, C. Heimann, N. Faust, G. Kauselmann, M. Schoor, R. Jaenisch, K. Rajewsky, R. Kuhn and F. Schwenk (2003). "Rapid generation of inducible mouse mutants." Nucleic Acids Res **31**(4): e12.
- Seliger, B., T. Cabrera, F. Garrido and S. Ferrone (2002). "HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells." Semin Cancer Biol **12**(1): 3-13.
- Shankaran, V., H. Ikeda, A. T. Bruce, J. M. White, P. E. Swanson, L. J. Old and R. D. Schreiber (2001). "IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." Nature **410**(6832): 1107-11.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts (2004). "Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases." Genes Dev **18**(22): 2699-711.
- Siren, J., J. Pirhonen, I. Julkunen and S. Matikainen (2005). "IFN-alpha regulates TLR-dependent gene expression of IFN-alpha, IFN-beta, IL-28, and IL-29." J Immunol **174**(4): 1932-7.
- Slamon, D. J., G. M. Clark, S. G. Wong, W. J. Levin, A. Ullrich and W. L. McGuire (1987). "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene." Science **235**(4785): 177-82.
- Smyth, M. J., K. Y. Thia, S. E. Street, E. Cretney, J. A. Trapani, M. Taniguchi, T. Kawano, S. B. Pelikan, N. Y. Crowe and D. I. Godfrey (2000). "Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells." J Exp Med **191**(4): 661-8.
- Smyth, M. J., K. Y. Thia, S. E. Street, D. MacGregor, D. I. Godfrey and J. A. Trapani (2000). "Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma." J Exp Med **192**(5): 755-60.
- Street, S. E., E. Cretney and M. J. Smyth (2001). "Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis." Blood **97**(1): 192-7.
- Street, S. E., J. A. Trapani, D. MacGregor and M. J. Smyth (2002). "Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma." J Exp Med **196**(1): 129-34.
- Stutman, O. (1974). "Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice." Science **183**(124): 534-6.

- Su, Z., J. Dannull, B. K. Yang, P. Dahm, D. Coleman, D. Yancey, S. Sichi, D. Niedzwiecki, D. Boczkowski, E. Gilboa and J. Vieweg (2005). "Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer." J Immunol **174**(6): 3798-807.
- Taki, S., T. Sato, K. Ogasawara, T. Fukuda, M. Sato, S. Hida, G. Suzuki, M. Mitsuyama, E. H. Shin, S. Kojima, T. Taniguchi and Y. Asano (1997). "Multistage regulation of Th1-type immune responses by the transcription factor IRF-1." Immunity **6**(6): 673-9.
- Tamura, T., M. Ishihara, M. S. Lamphier, N. Tanaka, I. Oishi, S. Aizawa, T. Matsuyama, T. W. Mak, S. Taki and T. Taniguchi (1995). "An IRF-1-dependent pathway of DNA damage-induced apoptosis in mitogen-activated T lymphocytes." Nature **376**(6541): 596-9.
- Tan, R. S., T. Taniguchi and H. Harada (1996). "Identification of the lysyl oxidase gene as target of the antioncogenic transcription factor, IRF-1, and its possible role in tumor suppression." Cancer Res **56**(10): 2417-21.
- Tanaka, N., M. Ishihara, M. Kitagawa, H. Harada, T. Kimura, T. Matsuyama, M. S. Lamphier, S. Aizawa, T. W. Mak and T. Taniguchi (1994). "Cellular commitment to oncogene-induced transformation or apoptosis is dependent on the transcription factor IRF-1." Cell **77**(6): 829-39.
- Tanaka, N., M. Ishihara and T. Taniguchi (1994). "Suppression of c-myc or fosB-induced cell transformation by the transcription factor IRF-1." Cancer Lett **83**(1-2): 191-6.
- Tanaka, N., T. Kawakami and T. Taniguchi (1993). "Recognition DNA sequences of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2, regulators of cell growth and the interferon system." Mol Cell Biol **13**(8): 4531-8.
- Taniguchi, T., K. Ogasawara, A. Takaoka and N. Tanaka (2001). "IRF family of transcription factors as regulators of host defense." Annu Rev Immunol **19**: 623-55.
- Taub, D. D., A. R. Lloyd, K. Conlon, J. M. Wang, J. R. Ortaldo, A. Harada, K. Matsushima, D. J. Kelvin and J. J. Oppenheim (1993). "Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells." J Exp Med **177**(6): 1809-14.
- Tora, L., A. Mullick, D. Metzger, M. Ponglikitmongkol, I. Park and P. Chambon (1989). "The cloned human oestrogen receptor contains a mutation which alters its hormone binding properties." Embo J **8**(7): 1981-6.
- van Bleek, G. M. and S. G. Nathenson (1992). "Presentation of antigenic peptides by MHC class I molecules." Trends Cell Biol **2**(7): 202-7.

- van den Broek, M. E., D. Kagi, F. Ossendorp, R. Toes, S. Vamvakas, W. K. Lutz, C. J. Melief, R. M. Zinkernagel and H. Hengartner (1996). "Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice." J Exp Med **184**(5): 1781-90.
- van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth and T. Boon (1991). "A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma." Science **254**(5038): 1643-7.
- Venturi, G. M., R. M. Conway, D. A. Steeber and T. F. Tedder (2007). "CD25+CD4+ regulatory T cell migration requires L-selectin expression: L-selectin transcriptional regulation balances constitutive receptor turnover." J Immunol **178**(1): 291-300.
- Vigui  r, M., F. Lema  tre, O. Verola, M. S. Cho, G. Goro  chov, L. Dubertret, H. Bachelez, P. Kourilsky and L. Ferradini (2004). "Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells." J Immunol **173**(2): 1444-53.
- Weinberg, R. A. (1995). "The retinoblastoma protein and cell cycle control." Cell **81**(3): 323-30.
- White, L. C., K. L. Wright, N. J. Felix, H. Ruffner, L. F. Reis, R. Pine and J. P. Ting (1996). "Regulation of LMP2 and TAP1 genes by IRF-1 explains the paucity of CD8+ T cells in IRF-1-/- mice." Immunity **5**(4): 365-76.
- Willman, C. L., C. E. Sever, M. G. Pallavicini, H. Harada, N. Tanaka, M. L. Slovak, H. Yamamoto, K. Harada, T. C. Meeker, A. F. List and et al. (1993). "Deletion of IRF-1, mapping to chromosome 5q31.1, in human leukemia and preleukemic myelodysplasia." Science **259**(5097): 968-71.
- W  ckel, V. Etablierung von konstitutiver und regulierbarer IRF-1 Expression in murinen Zelllinien, Diplomarbeit
- Xie, R. L., S. Gupta, A. Miele, D. Shiffman, J. L. Stein, G. S. Stein and A. J. van Wijnen (2003). "The tumor suppressor interferon regulatory factor 1 interferes with SP1 activation to repress the human CDK2 promoter." J Biol Chem **278**(29): 26589-96.
- Yim, J. H., S. J. Wu, M. J. Casey, J. A. Norton and G. M. Doherty (1997). "IFN regulatory factor-1 gene transfer into an aggressive, nonimmunogenic sarcoma suppresses the malignant phenotype and enhances immunogenicity in syngeneic mice." J Immunol **158**(3): 1284-92.
- Yee, C., J. A. Thompson, D. Byrd, S. R. Riddell, P. Roche, E. Celis and P. D. Greenberg (2002). "Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 16168-73.

- Yu, P., Y. Lee, W. Liu, T. Krausz, A. Chong, H. Schreiber and Y. X. Fu (2005). "Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors." J Exp Med **201**(5): 779-91.
- Zimring, J. C., S. Goodbourn and M. K. Offermann (1998). "Human herpesvirus 8 encodes an interferon regulatory factor (IRF) homolog that represses IRF-1-mediated transcription." J Virol **72**(1): 701-7.
- Zinkernagel, R. M. and P. C. Doherty (1979). "MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T-cell restriction-specificity, function, and responsiveness." Adv Immunol **27**: 51-177.

Danksagung

Herrn Dr. Gerhard Gross möchte ich für die Übernahme der akademischen Betreuung sowie für die Beurteilung dieser Doktorarbeit recht herzlich danken. Bei Herrn Dr. Gerhard Gross und Herrn Prof. Dr. Jürgen Wehland möchte ich mich dafür bedanken, dass sie diese Arbeit vor der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Technischen Universität Braunschweig vertreten. Herrn Prof. Dr. Martin Korte danke ich für seine Bereitschaft zur Teilnahme an der Prüfungskommission.

Mein besonderer Dank richtet sich an Herrn Dr. Hansjörg Hauser für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Genregulation und Differenzierung am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig durchzuführen. Für die Betreuung der Dissertation, seine Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft sowie das Korrekturlesen möchte ich mich außerdem bedanken.

Meiner Betreuerin Dr. Andrea Kröger möchte ich für die Einführung in die Tricks und Kniffe des Laboralltags danken. Desweiteren möchte ich mich für ihre Ratschläge, ihre Unterstützung und das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Ein Dankeschön geht an alle Kollegen der Arbeitsgruppe RDIF, vor allem an die D2.44-Mädels Anja, Julia, Andrea, Martina und Franziska für die nette Zeit während meiner Doktorarbeit. Viola danke ich besonders für die Unterstützung während der Nachtschichten am FACS. Martina gilt mein Dank für ihre Unterstützung bei technischen Problemen und für ihre Fähigkeit „das Labor zusammenzuhalten“.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern für ihre Fürsorge und grenzenlose Unterstützung, ohne die ich nicht dort stehen würde, wo ich jetzt bin.

Mein allerherzlichster Dank gilt meinem Mann Marc, der mit mir alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit durchgestanden hat und mir die Kraft zum Durchhalten gab.

